

**Erfahrungen
mit einem Enzymimmunoassay
(ELISA) zum Nachweis
von Spermatozoenantikörpern.
Untersuchungen an infertilen Männern
und Frauen sowie an homosexuellen Männern**

Hans Wolff

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Erfahrungen mit einem Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis
von Spermatozoenantikörpern. Untersuchungen an infertilen
Männern und Frauen sowie an homosexuellen Männern.

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
H a n s W o l f f
aus Weidenbach
München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W.-B. Schill

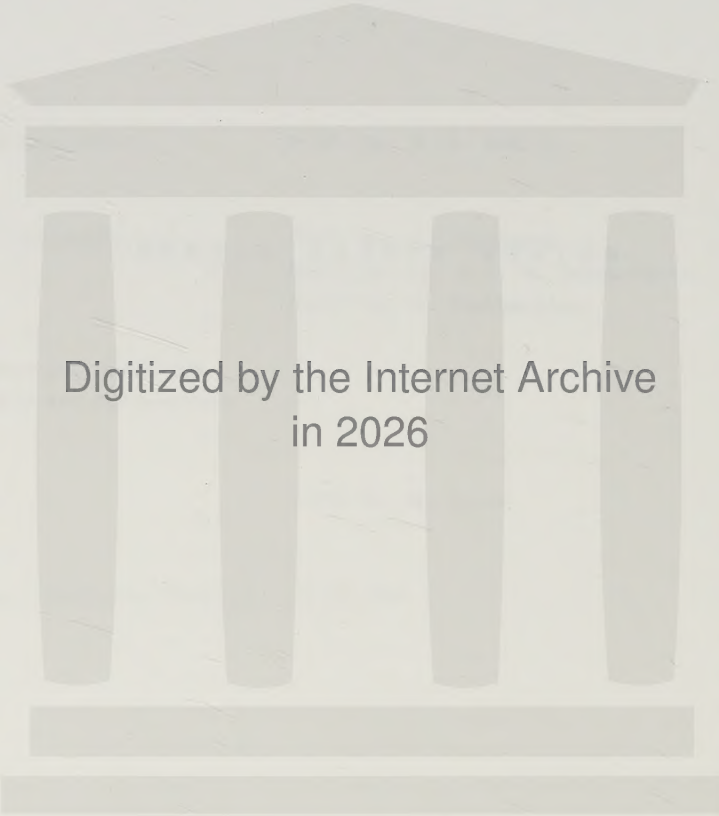
Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Baethmann
Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco
Prof. Dr. G. Riethmüller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.1986

MEINEN LIEBEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0031

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
0. ABKÜRZUNGEN	VII
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. ANTIGENE DES SPERMAS	3
2.1.1. URSACHEN DER ANTIGENITÄT VON SPERMATOZOEN	3
2.1.2. ANTIGENE DES SEMINALPLASMAS	4
2.1.3. SPERMATOZOENANTIGENE	5
2.2. AUSLÖSER DER SPERMATOZOENANTIKÖRPERBILDUNG BEIM MANN	8
2.2.1. VASEKTOMIE	10
2.2.2. ENTZÜNDUNG	11
2.2.3. TRAUMA	11
2.2.4. DISPOSITION	12
2.2.5. ANALVERKEHR BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN	13
2.3. METHODEN ZUM NACHWEIS VON SPERMATOZOENANTIKÖRPERN	14
2.3.1. GELATINE-AGGLUTINATIONSTEST (GAT)	15
2.3.2. OBJEKTTRÄGER-AGGLUTINATIONSTEST (TAT)	15
2.3.3. SPERMATOZOEN-IMMOBILISATIONSTEST (SIT)	16
2.3.4. SPERMATOZOEN-ZERVIXMUKUS KONTAKT TEST (SCMC)	16
2.3.5. HETEROLOGER OVUMPENETRATIONSTEST (HOP)	17
2.3.6. INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ (IFT)	18
2.3.7. MIXED AGGLUTINATION REACTION (MAR-TEST)	19
2.3.8. ENZYMMUNOASSAY (ELISA)	20

2.4.	HÄUFIGKEIT VON SPERMATOZOENANTIKÖRPERN BEI INFERTILEN MÄNNERN	22
2.5.	THERAPIE DER IMMUNOLOGISCHEN INFERTILITÄT DES MANNES	24
2.5.1.	GLUKOKORTIKOIDE	24
2.5.2.	ANDERE THERAPIEMÖGLICHKEITEN	25
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	26
3.1.	ZIELSETZUNG	26
3.2.	MATERIAL	27
3.2.1.	SEREN	27
3.2.2.	SEMINALPLASMEN	27
3.2.3.	ZERVIKALSCHLEIME	27
3.2.4.	UNTERSUCHUNGSGRUPPEN	28
3.3.	METHODEN	29
3.3.1.	METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM SPERMATOZOENANTI-KÖRPER-ELISA	29
3.3.1.1.	MIKROTITERPLATTEN	29
3.3.1.2.	SPERMATOZOEN ALS ANTIGENE	29
3.3.1.3.	BESCHICHTUNG DER MIKROTITERPLATTEN	30
3.3.1.4.	VARIATIONEN ZUM TESTABLAUF	31
3.3.1.5.	KONTROLLEN	31
3.3.1.6.	PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	31
3.3.1.7.	EINFLUSS DES KOMPLEMENTSYSTEMS	32
3.3.1.8.	WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER PROBEN	32
3.3.1.9.	VERGLEICH DES ELISA MIT ANDEREN SPERMATOZOEN-ANTIKÖRPERTESTS	32
3.3.1.10.	PUFFERLÖSUNGEN	33

3.3.2.	GELATINE-AGGLUTINATIONSTEST NACH KIBRICK	33
3.3.2.1.	DURCHFÜHRUNG DES GELATINE-AGGLUTINATIONSTESTS	33
3.3.2.2.	KONTROLLEN BEIM GELATINE-AGGLUTINATIONSTEST	34
3.3.2.3.	BEURTEILUNG DES GELATINE-AGGLUTINATIONSTESTS	34
3.3.3.	BESTIMMUNG DER IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN	34
3.3.4.	ANAMNESE UND KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG DER ANDRO- LOGISCHEN PATIENTEN	35
3.3.5.	EJAKULATBEFUNDE DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN	35
3.3.6.	VERFLÜSSIGUNG DER ZERVIKALSCHLEIME	35
3.3.6.1.	VERFLÜSSIGUNG DURCH BROMELIN	35
3.3.6.2.	VERFLÜSSIGUNG DURCH ULTRASCHALL	36
3.3.7.	BESTIMMUNG DER LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPER BEI DEN HOMOSEXUELLEN MÄNNERN	36
3.3.8.	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	36
3.4.	ERGEBNISSE	37
3.4.1.	ERGEBNISSE DER METHODISCHEN UNTERSUCHUNGEN ZUM SPERMATOZOENANTIKÖRPER-ELISA	37
3.4.1.1.	MIKROTITERPLATTEN	37
3.4.1.2.	SPERMATOZOEN ALS ANTIGENE	37
3.4.1.3.	BESCHICHTUNG DER MIKROTITERPLATTEN	38
3.4.1.4.	VARIATIONEN ZUM TESTABLAUF	39
3.4.1.5.	OPTIMALE DURCHFÜHRUNG DES ELISA	40
3.4.1.6.	BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE	41
3.4.1.7.	KONTROLLEN	42
3.4.1.8.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER-TITRATIONSKURVEN	42
3.4.1.9.	EINFLUSS DES KOMPLEMENTSYSTEMS	44
3.4.1.10.	WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER PROBEN	44
3.4.1.11.	PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT DES ELISA	44

3.4.1.12.	VERGLEICH DES ELISA MIT ANDEREN SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPERTESTS	45
3.4.1.13.	VERFLÜSSIGUNG DER ZERVIKALSCHLEIME	47
3.4.2.	ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN	48
3.4.2.1.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER IN VERSCHIEDENEN UNTERSUCHUNGSGRUPPEN	48
3.4.2.2.	ANAMNESE UND KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG DER ANDRO- LOGISCHEN PATIENTEN	50
3.4.2.3.	EJAKULATBEFUNDE DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN	51
3.4.2.4.	IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN	52
3.4.2.4.1.	IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN IN SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPER-POSITIVEN UND -NEGATIVEN SEREN	52
3.4.2.4.2.	IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN DER SEMINALPLASMEN	55
3.4.2.5.	LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPER BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN	56
3.4.2.6.	BEZIEHUNG ZWISCHEN LAV/HTLV-III- UND SPERMATO- ZOENANTIKÖRPERN BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN	57
4.	DISKUSSION	58
4.1.	DISKUSSION DER METHODISCHEN UNTERSUCHUNGEN ZUM SPERMATOZOENANTIKÖRPER-ELISA	58
4.1.1.	VORWORT	58
4.1.2.	MIKROTITERPLATTEN	59
4.1.3.	SPERMATOZOEN ALS ANTIGENE	59
4.1.4.	KONTROLLEN	60
4.1.5.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER-TITRATIONS-KURVEN	61
4.1.6.	PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT DES ELISA	61
4.1.7.	EINFLUSS DES KOMPLEMENTSYSTEMS	62

4.1.8.	WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER PROBEN	62
4.1.9.	VERGLEICH DES ELISA MIT ANDEREN SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPERTESTS	62
4.1.10.	FALSCH-POSITIVE REAKTIONEN IM ELISA	64
4.1.11.	FALSCH-NEGATIVE RESULTATE IM ELISA	65
4.1.12.	LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES ELISA	65
4.1.13.	VERFLÜSSIGUNG DER ZERVIKALSCHLEIME	66
4.2.	DISKUSSION DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN	67
4.2.1.1.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI FERTILEN MÄNNERN	68
4.2.1.2.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI DERMATOLOGISCHEN PATIENTEN	68
4.2.1.3.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI ANDROLOGISCHEN PATIENTEN	69
4.2.1.4.	HOMOSEXUELLE MÄNNER	71
4.2.1.4.1.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN	71
4.2.1.4.2.	LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPER BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN	72
4.2.1.4.3.	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN SPERMATOZOENANTIKÖRPERN UND LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPERN BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN	74
4.2.1.4.4.	IMMUNSUPPRESSIVE EIGENSCHAFTEN DES SEMINALPLASMAS	75
4.2.1.5.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI LUES-PATIENTEN	76
4.2.1.6.	SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI INFERTILEN FRAUEN	76
4.2.2.	ANAMNESE, KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG UND EJAKULAT- BEFUNDE DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN	77
4.2.2.1.	IN ALLEN UNTERGRUPPEN GLEICHMÄßIG VERTEILTE PARAMETER	77
4.2.2.2.	ANDROLOGISCHE PATIENTEN MIT IgG-SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPERN IM SERUM	78
4.2.2.3.	ANDROLOGISCHE PATIENTEN MIT IgM-SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPERN IM SERUM	79
4.2.2.4.	ANDROLOGISCHE PATIENTEN MIT IgA- UND IgG-SPERMA- TOZOENANTIKÖRPERN IM SEMINALPLASMA	80

4.2.3.	IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN	81
4.2.3.1.	IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN IN SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPER-POSITIVEN UND -NEGATIVEN SEREN	81
4.2.3.2.	IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN DER SEMINALPLASMEN	82
5.	ZUSAMMENFASSUNG	83
6.	LITERATURVERZEICHNIS	86
7.	DANKSAGUNG	107
8.	LEBENS LAUF	108

O. ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
CM	Zervixmukus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GAT	Gelatine-Agglutinationstest
HOP	Heterologer Ovumpenetrationstest
IFT	Immunfluoreszenztechnik
Ig	Immunglobulin
M	Medianwert
MAk	Monoklonaler Antikörper
MAR	Mixed Agglutination Reaction
mg/dl	Milligramm pro 100 ml Serum bzw. Seminalplasma
s	Standardabweichung
SA	Spermatozoenantikörper
SCMC	Spermatozoen-Zervixmukus Kontakt Test
SIT	Spermatozoen-Immobilisationstest
SP	Seminalplasma
TAT	Objektträger-Agglutinationstest
$\bar{x}$	Mittelwert
WBT	Western-Blot-Technik

1. EINLEITUNG

Durch die Pionierexperimente LANDSTEINERS (95), METCHNIKOFFS (110) und METALNIKOV'S (109) zu Anfang dieses Jahrhunderts ist bekannt, daß Sperma Antigene enthält, die die Bildung von Antikörpern auslösen können. Seit den fünfziger Jahren mehren sich Berichte, daß auch ein Teil der Fälle weiblicher und männlicher Unfruchtbarkeit auf Spermatozoenantikörper zurückzuführen ist (38,45,70,78,93,128).

Dennoch ist es bisher nur wenigen andrologischen und gynäkologischen Zentren vorbehalten, Seren und Genitalsekrete infertiler Patienten auf Spermatozoenantikörper zu untersuchen.

Hierzu gehört auch die andrologische Abteilung der Universitäts-Hautklinik München unter Leitung von Prof. Dr. med. W.-B. Schill. Obwohl 1983 insgesamt 3327 Spermauntersuchungen bei 1787 Patienten zur Diagnostik und Therapieüberwachung durchgeführt wurden, konnten nur bei 44 Patienten Serum und Seminalplasma auf Spermatozoenantikörper untersucht werden. Dies geschah vornehmlich mit dem Gelatine-Agglutinationstest nach KIBRICK u. Mitarb. (87) und vereinzelt auch mit dem Spermatozoen-Zervixmukus Kontakt Test nach KREMER und JAGER (93).

Die relativ geringe Zahl der durchgeführten Untersuchungen erklärt sich aus dem großen zeitlichen und organisatorischen Aufwand, der für diese Tests vonnöten ist und der z.T. angezweifelte klinische Bedeutung der Spermatozoenantikörper.

Seit kurzem wird von einigen Arbeitsgruppen die erstmals 1974 von VOLLER und BIDWELL (155) beschriebene ELISA-Technik (enzyme-linked immunosorbent assay) auf ihre Anwendbarkeit zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern überprüft (2,116,120,162,164,171).

Ziel dieser Arbeit war es, einen Enzymimmunoassay zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern zu entwickeln und durch Vergleich mit anderen Spermatozoenantikörpertests zu charakterisieren.

Des weiteren sollten die Häufigkeiten von Spermatozoenantikörpern in verschiedenen Patienten- und Kontrollkollektiven ermittelt werden. Die mit Hilfe des ELISA gefundenen Spermatozoenantikörper-positiven Seren und Seminalplasmen sollten dann mit anderen Labormethoden weiter charakterisiert werden. Ferner sollten die Befunde aus den Anamnesen, körperlichen Untersuchungen und Ejakulatuntersuchungen mit den Spermatozoenantikörper-Resultaten korreliert werden.

Außer bei infertilen Männern und Frauen könnten Spermatozoenantikörper möglicherweise auch bei homosexuellen Männern im Zusammenhang mit dem erworbenen Immundefektsyndrom "AIDS" (55) eine Rolle spielen. So stellten 1980 MATHUR u. Mitarb. (103) antigene Kreuzreaktionen zwischen Spermatozoen und T-Lymphozyten fest. Unter Umständen üben die bei homosexuellen Männern häufig vorkommenden Spermatozoenantikörper (107,160) als sogenannte Kofaktoren einen negativen Einfluß auf das T-zelluläre Immunsystem aus, so daß es u.a. zu einer leichteren Ansteckung durch das LAV/HTLV-III-Virus, dem Erreger des AIDS-Syndroms (14,52), kommen könnte.

Deshalb war es ein weiteres Anliegen dieser Arbeit, einem möglichen Zusammenhang zwischen Spermatozoenantikörpern und LAV/HTLV-III-Antikörpern bei homosexuellen Männern nachzugehen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. ANTIGENE DES SPERMAS

2.1.1. URSACHEN DER ANTIGENITÄT VON SPERMATOZOEN

Seit METCHNIKOFF 1899 (110) weiblichen Meerschweinchen Rinder-, Menschen- oder Meerschweinchenspermatozoen injizierte, und diese daraufhin spermatozoenagglutinierende und -immobilisierende Serumantikörper bildeten, weiß man um die hohe Antigenität von Samenbestandteilen. Auf der Suche nach einer kontrazeptiv wirkenden Vakzine gelang es BASKIN 1932 (16) bei Frauen durch Injektion von Spermatozoen der Ehemänner die Bildung von Isoantikörpern auszulösen, was mit einer temporären Unfruchtbarkeit der Frauen einherging.

Bedenkt man aber, daß auch andere homologe Substanzen wie z.B. der Rhesusfaktor auf Erythrozyten die Produktion spezifischer Antikörper auslösen können, weist bei den Befunden BASKINS noch nichts auf eine spezielle Antigenität der Spermatozoen hin. Darauf deuten jedoch Berichte von RÜMKE (123) und WILSON (159), die 1954 unabhängig voneinander unfruchtbare Männer beschrieben, in deren Seren und Seminalplasmen "natürlich" aufgetretene Spermatozoenantikörper gegen ihre eigenen Spermatozoen nachgewiesen wurden.

Dieses Autoimmunphänomen läßt sich dadurch erklären, daß Spermatozoen zum Zeitpunkt der Ausbildung der Immuntoleranz während der Embryonal- und Fetalperiode (27) noch nicht vorhanden sind. Später, wenn die Spermatozoen in der Pubertät erstmals auftreten, werden sie bei Kontakt mit dem Immunsystem von diesem als körperfremd angesehen und bekämpft, da sie zum Teil neue, spezifische Antigenstrukturen besitzen (38).

Damit es beim Mann nicht zur immunologischen Autosterilisation kommt, müssen deshalb Immunsystem und Samenwege räumlich getrennt sein. Dies wird unter anderem durch die sogenannte "Blut-Hoden-

Schranke" gewährleistet, die durch dichte Anordnung der Sertoli- und Epithelzellen ("tight junctions") den Austritt von Spermatozoenantigenen aus den Hodentubuli und ableitenden Samenwegen verhindert (81,150). Die Wichtigkeit dieses Separationsapparates zeigen sehr eindrucksvoll die Experimente von MANCINI u. Mitarb. (100): Männern, denen wegen Prostatakrebses beide Hoden entfernt werden sollten, wurde intrakutan homologes oder autologes Hoden-homogenisat injiziert. Daraufhin traten zirkulierende Spermatozoenantikörper auf, die in Verbindung mit einer zellulären Immunreaktion die noch im Hodensack befindlichen Testikel so stark schädigten, daß bei manchen Männern sogar eine Aspermatogenese eintrat.

Beim Versuch, Antigene des Spermas genauer zu charakterisieren, muß zwischen Antigenen des Seminalplasmas und Antigenen, die schon im Hoden und Nebenhoden feste Bestandteile der Samenzellen waren, unterschieden werden.

Kritisch sollte man bei Durchsicht der Literatur mit dem Begriff "Antigen" umgehen. Substanzen, die bei einer heterologen Immunisierung im Tierversuch (z.B. Humanspermatozoen - Mäuse) Heteroantikörper hervorrufen, müssen in einer homologen Situation (Humansperma - Ehefrau) nicht unbedingt die Bildung von Isoantikörpern auslösen; noch weniger wahrscheinlich ist, daß alle im Tierversuch immunogenen Spermatozoenbestandteile auch beim Mann fähig sind, Autoantikörper auszulösen.

2.1.2. ANTIGENE DES SEMINALPLASMAS

Mit Hilfe der Immunelektrophorese von humanem Seminalplasma konnte gezeigt werden, daß viele anorganische und organische Serumbestandteile durch Transsudation via Prostata und Bläschen-drüsen in das Seminalplasma gelangen (133,139). Unter anderem werden im Seminalplasma Albumin, α -, β -, γ -Globuline, ABO-Blutgruppenantigene bei Sekretoren, Enzyme, Hormone und Immunglobuline gefunden.

Außerdem wurden im Seminalplasma mehrere organspezifische Substanzen nachgewiesen, die in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet werden und im Serum oder anderen Körpergeweben nicht oder nur in Spuren vorhanden sind. In Anlehnung an einen von WEIL und RODENBURG (157) beschriebenen in den Bläschendrüsen gebildeten Stoff werden diese Substanzen auch "spermatozoa coating antigens" genannt. Das quantitativ bedeutendste "spermatozoa coating antigen" ist Lactoferrin, ein eisenbindendes Glykoprotein, das außer durch die Bläschendrüsen auch von anderen exokrinen Drüsen des Körpers gebildet wird. Damit dürfte Lactoferrin keine autoantigene Wirkung beim Mann und nur geringe antigene Wirkung bei der Frau haben (64).

Da humanes Seminalplasma ein Gemisch aus vielerlei potentiell antigenen Substanzen darstellt, ist es wenig erstaunlich, daß es im Tierversuch durch heterologe Immunisierung eine spezifische Antikörperbildung hervorrufen kann. Was jedoch die Problematik der in vivo auftretenden immunologischen Infertilität bei Mann und Frau anbelangt, so wird den Seminalplasmaantigenen nur eine sehr begrenzte Bedeutung zugesprochen (17,21,83,124).

Manche Autoren diskutieren die "spermatozoa coating antigens" sogar als protektive Faktoren, die potente Spermatozoenantigene abdecken und so vor einer Immunreaktion im weiblichen Genitaltrakt schützen können (17,83).

2.1.3. SPERMATOZOENANTIGENE

Um originäre Bestandteile der Spermatozoen handelt es sich bei den in haploider Form auf der Zelloberfläche exprimierten Merkmalen des HLA-Systems (36,86). Trotz kontroverser Publikationen (83,143), scheinen diese Antigene jedoch auf dem Gebiet der immunologischen Infertilität der Frau keine größere Bedeutung zu haben (83). Bei Männern besteht ebenso wie gegen die ABO-Antigene im Seminalplasma Immuntoleranz, da die HLA-Merkmale schon während der Fetalperiode vorhanden waren.

Tabelle 1. Spermatozoenantigene

Autoren	Ag-Lokalisation; Ag-Bezeichnung	Nachweis- methode	Biochemische Eigenschaften	Ak-Herkunft	Ak-Klasse	Ak Wirkung auf Spermatozoen
Hansen, Hjort (62)	-Akrosomspitze -Äquatorial- segment -Postnukleare Region -Schwanz- Hauptstück	IFT	-	Seren infertiler Frauen " " "		
Friberg (46)	-Kopf -Schwanz	TAT	-	Seren infertiler Männer und Frauen; Seren inf. Männer; SP inf. Männer	IgM IgG IgA	Kopf-Kopf Agglutination Kopf-Schwanz Aggl. Kopf-Schwanz Aggl.
Boettcher et al. (21)	-Schwanz -Schwanzspitze	TAT	-	Seren inf. Männer	IgG IgG	Schwanz-Schwanz Aggl. Schwanzspitzen Aggl.
Naz et al. 115)	-Postakrosom u. Mittelstück u. Schwanz	MAK- IFT, WBT	-Glykoprotein aus Hodenhomogenisat MW 23.000	MAK immun. Mäuse u. Seren vaskel. Männer	IgG ₂	Reduzierung der Bindungs- fähigkeit von Humansper- matozoen an Hamstererier
Isahakia u. Alexander (76)	-Akrosom diffus -Akrosom diffus -Akrosom gesprenkelt -Mittelstück -Äquatorial- segment -Schwanz	MAK- IFT, WBT	-Membranprotein MW 84.000 -im WBT nicht dar- stellbar -Membranprotein MW 240.000 -Membranprotein MW 30.000 -Membranprotein MW 71.000 -im WBT nicht darstellbar	MAK immun. Mäuse " " "	IgG IgG IgG IgM IgG	Kopf Kopf Agglutination, Immobilisation (++++ Immobilisation (++++ Kopf-Kopf Agglutination, Immobilisation (++++ keine Agglutination, keine Immobilisation keine Agglutination, Immobilisation (++++ keine Agglutination Immobilisation (++++
Zaneveld et al. (172)	-Akrosin	Enzym- hemmung	-akrosomales Enzym	Seren immun. Kaninchen	IgG	Inaktivierung der Enzymwirkung
Kille u. Goldberg(88)	-LDH-C ₄	Immun- diff.	-Zellstoff- wechselenzym	Seren immun. Kaninchen	IgG	Minderung der Befruchtungsfähigkeit
Kolk et al. (90)	-Protamin	IFT	-Zellkern- protein	Seren vaskel. Männer	IgG	Agglutination artifi- ziell geschwollener Sp.

Legende: Ag = Antigen; Ak = Antikörper; IFT = Immunfluoreszenztechnik; TAT = Objektträger Agglutinationstest;
MAK = Monoklonale Antikörper; WBT = Western-Blot-Technik; LDH-C₄ = Lactatdehydrogenase-C₄;

Um Spermatozoenantigene genauer zu differenzieren, bedient man sich unter anderem der indirekten Immunfluoreszenztechnik, die mit Hilfe von spermatozoenantikörperhaltigen Seren verschiedene Antigene durch ihre unterschiedliche regionale Verteilung sichtbar machen kann.

So zeigten HANSEN und HJORT (62), daß der vordere Teil des Akrosoms, das Äquatoralsegment, die postnukleäre Region und das Hauptstück des Schwanzes verschiedene Isoantigene beherbergen. Zu bedenken ist jedoch, daß die Autoren methanolfixierte Spermatozoen verwendeten, deren Antigene durch diese Behandlung alteriert, entfernt oder erst freigelegt worden sein könnten (106).

Die im Objektträger-Agglutinationstest nach FRIBERG (46) mikroskopisch sichtbaren unterschiedlichen Agglutinationsmuster (Kopf-Kopf, Schwanz-Schwanz) weisen ebenfalls auf mehrere Iso- und Autoantigene hin.

Obwohl mit diesen Methoden Spermatozoenantigene nachweisbar sind, weiß man bisher erst wenig über ihre biochemischen Eigenschaften. Zu den bisher identifizierten Spermatozoenantigenen gehört Protamin, ein basisches Zellkernprotein, das in der Spermatozoen-DNS anstelle der Histone zu finden ist (90). Die bei etwa 30% der Vasektomierten vorkommenden Protaminantikörper (9) dürften die Fertilität jedoch kaum mindern, da das Zellkernprotein bei intakten Spermatozoen für Spermatozoenantikörper nicht erreichbar ist.

Anders ist es mit dem Isoenzym Laktatdehydrogenase-C₄ oder -X, das als spermatozoenspezifisches Autoantigen sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran zu finden und somit für Spermatozoenantikörper zugänglich ist (88). In der großen WHO-Vergleichsstudie aus der Jahre 1977 (21) wurden allerdings nur in drei von 39 Spermatozoenantikörper-positiven Seren anti-LDH-X-Aktivitäten festgestellt; alle drei Seren stammten von Frauen.

Das im Akrosom vorkommende Enzym Akrosin ist möglicherweise ebenfalls antigen, doch dürfte dies für die immunologische Infertilität des Mannes nur von untergeordneter Bedeutung sein, da es bei

vitalen Spermatozoen erst nach der Kapazitation und Akrosomenreaktion für Spermatozoenantikörper zugänglich ist (21,114,171). Seit einiger Zeit steht für die Erforschung der Spermatozoenantigene eine neue Methode zur Verfügung: die von KÖHLER und MILSTEIN 1975 entwickelte Hybridomatechnik zur Erzeugung monoklonaler Antikörper (89). Hierbei werden Mäuse gegen Humanspermatozoen mehrfach immunisiert und nach etwa neun Wochen getötet. Die Milzzellen der Mäuse enthalten auch einige spermatozoenantikörperproduzierende B-Lymphozyten, die sich nach der Fusion mit Mäusemyelomzellen stark vermehren können.

Viele hundert Testansätze werden mit einem Enzymimmunoassay voruntersucht und bei positivem Ergebnis soweit verdünnt, daß eine einzige Hybridomzelle den Ausgangspunkt einer Zellkultur bildet. Da diese Zellen völlig gleichartig sind (monoklonal), produzieren sie auch identische Spermatozoenantikörper, die mit der Immunfluoreszenztechnik auf den Spermatozoen lokalisiert werden können.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Immunfluoreszenzuntersuchungen, die mit polyklonalen Antiseren arbeiteten, kann man nun mit Sicherheit davon ausgehen, daß nur eine einzige antigene Determinante für die Fluoreszenz verantwortlich ist.

Anhand der Hybridomatechnik und der Western-Blot-Technik, einer äußerst spezifischen Elektrophoresemethode (94), gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen bereits zahlreiche Spermatozoenantigene zu beschreiben (76,77,115). Die biochemische Charakterisierung der Antigene steht jedoch größtenteils noch aus.

2.2. AUSLÖSER DER SPERMATOZOENANTIKÖRPERBILDUNG BEIM MANN

Wie schon erwähnt, verhindert normalerweise die räumliche Trennung der autoantigenen Spermatozoen vom Immunsystem durch die Blut-Hoden-Schranke eine zelluläre oder humorale Immunreaktion (81,150).

Daß es bei manchen Männern trotzdem zu einer Spermatozoenantikörperbildung kommt, ist immer auf einen pathologischen Kontakt zwischen Spermatozoen und Immunsystem zurückzuführen. Im folgenden sind die Möglichkeiten beschrieben, die beim Mann zur Sensibilisierung gegen Spermatozoen führen können.

Tabelle 2. Auslöser der Spermatozoenantikörperbildung beim Mann

Auslöser	Autoren	Untersuchungsgruppen	n	Agglutinierende SA (Titer)	Immobilisierende SA (Titer)	Insgesamt SA
Vasektomie	Phadke u. Padukone (117)	Seren nichtvasekt. M. Seren vasekt. Männer	25 25	0% 32%	- -	0% 32%
Vasektomie	Ansbacher (10)	Seren vor Vasektomie Seren vasektomierter M. SP vasektomierter M.	55 48 42	2% (4) 54% (2-64) 0%	0% 31% (2-128) 0%	2% 54% 0%
Vasektomie	Schill et al. (131)	Seren vasektomierter M.	33	55% (2-128)	24% (2-16)	64%
Vasektomie	Lucas u. Rose (100)	Seren vor Vasektomie Seren nach Vasektomie	194 194	10% (≥ 4) 55% (4-1024)	2% (≥ 1) 32% (1-128)	10% 64%
Aplasie der Samenleiter	Rümke (124)	Seren von Männern mit Aplasie der Samenleiter	11	42% (≥ 4)	-	42%
Aplasie der Samenleiter	Girgis et al. (53)	Seren von Männern mit Aplasie der Samenleiter	14	71% (16-64)	57% (16-64)	71%
Hodenbiopsie	Hjort et al. (70)	Seren von M. 5 Wochen nach Hodenbiopsie	35	31%	-	31%
Entzündung	Bandhauer (12)	SA-positive Seren uro- logisch kranker Männer	29	In 66% der SA-positiven Seren lag eine Epididymitis vor.		
Entzündung, Infektion, Trauma	Haensch (60)	Seren SA-negativer M. Seren SA-positiver M.	2099 101	4% Gonorrh. 9% Gonorrh.	1% Mumpsorch. 8% Mumpsorch.	4% Hodentr. 10% Hodentr.
Analverkehr	Witkin u. Sonnabend (160)	Seren homosexueller M.	18	SA-Nachweis durch ELISA		56%
Analverkehr	Mavligit et al. (107)	Seren homosexueller M.	26	SA-Nachweis durch GAT und SIT		73%

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SP = Seminalplasma;

2.2.1. VASEKTOMIE

Die wohl am besten untersuchte Ursache eines unphysiologischen Kontaktes zwischen Spermatozoen und Immunsystem ist die Sterilisation des Mannes durch Unterbindung oder Teilresektion des Samenleiters (Ductus deferens). Dieses, in den USA millionenfach ausgeübte Verfahren, führt bei 50-60% der Männer zur Bildung von zirkulierenden Spermatozoenantikörpern (10,100,117,131).

Die Pathogenese beruht wahrscheinlich auf einer Überdehnung des Nebenhodenganges (Ductus epididymidis) durch einen akut auftretenden Sekret- und Spermatozoenstau (117,126,129). Die dadurch eintretende Lockerung der "tight junctions" erlaubt den Spermatozoen bzw. löslichen Spermatozoenantigenen den Austritt in das Interstitium des Nebenhodens, wo es zum Kontakt mit immunkompetenten Zellen kommen kann. 1971 wies RÜMKE bei älteren, nicht vasktomierten Männern eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit agglutinierender Spermatozoenantikörper im Serum und histologischen Zeichen eines Spermatozoenaustritts in das Nebenhodeninterstitium nach (126).

Doch nicht bei allen vasktomierten Männern kommt es zur Extravasation von Spermatozoen. Physiologischerweise werden überzählige Spermatozoen im Lumen des Ductus epididymidis durch Makrophagen ("Spermiophagen") eliminiert (117).

Zum Austritt ganzer Spermatozoen oder noch intakter Spermatozoenantigene kommt es nur, wenn die phagozytären Abbaumechanismen durch zu hohe Spermatozoenproduktion überfordert sind. So zeigen Untersuchungen von LINNET und HJORT (98), daß Männer mit hoher Spermatozoenzahl nach der Vasktomie auch höhere Spermatozoenantikörpertiter aufweisen.

2.2.2. ENTZÜNDUNGEN

Auslöser einer Spermatozoenantikörperbildung können auch spezifische und unspezifische Entzündungsgeschehen innerhalb des Genitaltraktes sein.

So beobachtete BANDHAUER bei 29 urologisch Kranken mit agglutinierenden Spermatozoenantikörpern im Serum in 19 Fällen (66%) eine Entzündung des Nebenhodens (12); HAENSCH (60) fand beim Vergleich von Männern mit und ohne Spermatozoenantikörpern im Serum in 9% gegen 4% eine positive gonorrhoeische Anamnese und in 8% gegen 1% eine abgelaufene Mumpsorchitis.

Die entzündlich-ödematöse Lockerung der Tubulusepithelzellen könnte eine Extravasation von Spermatozoenantigenen ermöglichen. Außerdem könnten Bakterien einen zusätzlichen Adjuvanseffekt auf das durch das Entzündungsgeschehen bereits alarmierte Immunsystem ausüben, so daß es leichter zu einer Sensibilisierung gegen Spermatozoenantigene kommen kann (12,160).

2.2.3. TRAUMA

Aus Tierexperimenten weiß man, daß viele Arten von Traumata im Bereich des Hodens (Torsion, Druck, Erhitzen, Einfrieren, Schneiden) zur Bildung von Spermatozoenantikörpern und einer zellulären Immunreaktion führen können (1,98,101,115).

Auch beim Menschen könnten Traumata in einzelnen Fällen eine Rolle spielen; HAENSCH (60) berichtet, daß von 101 Männern mit Spermatozoenantikörpern 10% anamnestisch ein Hodentrauma angeben, gegenüber nur 4% von 2099 Männern ohne Spermatozoenantikörper. HJORT u. Mitarb. (70) beschrieben eine vorübergehende Serumantikörperbildung in 11 von 35 Fällen (31%) fünf Wochen nach Durchführung einer Hodenbiopsie.

Andererseits zeigte bei einer Untersuchung von zehn im Genitalbereich gefolterter Männer sechs Jahre danach nur ein Mann Spermatozoenantikörper im Serum (30).

Bei postpubertären Hodentorsionen, die länger als 24 Stunden unbehandelt bleiben, beobachtet man in einigen Fällen eine degenerative Veränderung auch des nicht torquierten kontralateralen Hodens (15). Tierexperimentelle Befunde sprechen für die Möglichkeit einer Schädigung durch humorale und zelluläre Autoimmunmechanismen, die durch die Freisetzung von Spermatozoenantigenen aus dem torquierten Hoden induziert worden sein könnten (97,114).

2.2.4. DISPOSITION

Auf einen weiteren wichtigen Aspekt der Immunreaktion gegen Spermatozoen weist RUMKE (124) hin, der 11 Männer mit Aplasie der Samenleiter untersuchte. Die Aplasie der Samenleiter entspricht in etwa der Situation nach Vasektomie, so daß in dieser Gruppe von Männern eine hohe Spermatozoenantikörperprävalenz zu erwarten war.

Die fünf Männer, die agglutinierende Spermatozoenantikörper aufwiesen, hatten gleichzeitig auch höhere Antikörpertiter gegen das Masernvirus. Geht man davon aus, daß alle Männer in ihrer Jugend die Masern durchgemacht hatten, so kann man bei den Männern mit höheren Masernantikörpertitern und vorhandenen Spermatozoenantikörpern von "besseren" Antikörperbildnern ("high responders") sprechen.

Die Bildung von Spermatozoenantikörpern hängt somit wahrscheinlich auch von der zum Teil genetisch determinierten Reaktivität des Immunsystems ab.

Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen von MATHUR u. Mitarb. (104), die eine signifikante Häufung der HLA-Antigene B 7 und Bw 35 bei infertilen Patienten mit Spermatozoenantikörpern feststellten. Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß Menschen mit diesen HLA-Merkmalen eine genetisch determinierte Prädisposition u.a. zur Bildung von Spermatozoenantikörpern in sich tragen.

2.2.5. ANALVERKEHR BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN

Im Vergleich zu den vorher genannten Möglichkeiten, handelt es sich bei Spermatozoenantikörpern von homosexuellen Männern meist nicht um Auto- sondern um Isoantikörper, die gegen die rektal oder oral applizierten Spermatozoen des Sexualpartners gerichtet sind.

Im Gegensatz zum mehrschichtigen Plattenepithel der Vagina, kommt es beim nur einschichtigen Zylinderepithel des Rektums während des Sexualverkehrs leicht zu Einrissen der Schleimhaut und durch Blut-Sperma Kontakt zur Immunisierung gegen Spermatozoen (107).

Von 18 durch WITKIN und SONNABEND (160) untersuchten homosexuellen Männern hatten 10 (56%) zirkulierende Spermatozoenantikörper der Klasse IgG. MAVLIGIT u. Mitarb. (107) wiesen bei 19 (73%) von 26 Homosexuellen, die passiven Analverkehr betrieben, zirkulierende Spermatozoenantikörper nach.

2.3. METHODEN ZUM NACHWEIS VON SPERMATOZOENANTIKÖRPERN

Aus der Vielzahl verschiedener Nachweismethoden für Spermatozoen-antikörper werden an dieser Stelle nur die am weitest verbreiteten oder erfolgversprechendsten Tests vorgestellt (s.a. Tab.3).

Tabelle 3. Methoden zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern

Spermatozoen-Antikörpertest	Abkürzung	Untersuchbares Kompartiment	Nachweisbare SA-Effekte	Ig-Klasse	Sensitivität	Bewertung	Kapazität (Proben/Tag)
Gelatine-Agglutinationstest (87)	GAT	Serum, SP, CM	Agglutination	unbekannt	++	subjektiv	20
Objektträger-Agglutinationstest (46)	TAT	Serum, SP, CM	Agglutination	unbekannt	+++	subjektiv	30
Spermatozoen Immobilisationstest (78)*	SIT	Serum, SP, CM	Immobilisation	unbekannt	+	subjektiv	20
Spermatozoen-Zervixmukus Kontakt Test (93)	SCMC	Ejakulat, CM	Immobilisation, "Shaking Phenomenon"	unbekannt	++	subjektiv	4
Heterologer Ovum-Penetrationstest (169)	HOP	Serum, SP, CM	Minderung der Befruchtungsfähigkeit	unbekannt	++	subjektiv	10
Immunfluoreszenztechnik (62)	IFT	Serum, SP, CM	unbekannt	bekannt	++	subjektiv	30
MAR-Test (79)	MAR	Ejakulat	unbekannt	bekannt	++	subjektiv	30
Enzymimmunoassay	ELISA	Serum, SP, CM	unbekannt	bekannt	+++	objektiv	120

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SP = Seminalplasma; CM = Zervixmukus; Ig Immunglobulin.

2.3.1. GELATINE-AGGLUTINATIONSTEST (GAT)

Originalbezeichnung: "Gelatin Agglutination Test" nach KIBRICK u. Mitarb. (87), modifiziert nach Schill u. Mitarb. (132).

Einer Mischung aus erwärmter Gelatine und frischem Spenderejakulat mit mindestens 80% Gesamtmotilität werden Serum- oder Seminalplasmaverdünnungen des Patienten zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wird das in Kapillarröhrchen aufgezogene Gemisch betrachtet.

Eine homogen-milchige Trübung zeigt ein negatives Ergebnis an, während Spermatozoenausflockungen auf agglutinierende Antikörper hinweisen. Die hohe Viskosität der Gelatine verhindert eine Sedimentation der Spermatozoenagglutinate.

-Vorteile: durch weltweite Anwendung gewisse Vergleichbarkeit der Resultate; schnelle Ablesbarkeit.

-Nachteile: Bedarf an frischem Spenderejakulat hervorragender Qualität; subjektive Bewertung; falsch-positive Resultate durch unspezifische Serum-B-Spermagglutinine (19); keine Information über die Agglutinationsmuster (Kopf-Kopf, Schwanz-Schwanz etc.) und über die Immunglobulinklasse der Spermatozoenantikörper; geringe Sensitivität (21,42).

2.3.2. OBJEKTTRÄGER-AGGLUTINATIONSTEST (TAT)

Originalbezeichnung: "Tray Agglutination Test" nach FRIBERG (46). Kleinste Mengen (5 µl) der Serum- oder Seminalplasmaverdünnungen des Patienten werden mit 1 µl Spenderejakulat in den Vertiefungen einer Gewebetypisierungsplatte vermischt und mit Paraffin abgedeckt. Nach vier Stunden Inkubation bei Raumtemperatur werden unter einem Invertmikroskop neben der Zahl und Größe der Spermatozoenagglutinate auch verschiedene Agglutinationstypen beurteilt: Kopf-Kopf, Kopf-Schwanz, Schwanz-Schwanz, Schwanzspitze-Schwanzspitze.

-Vorteile: durch Verwendung von Mikromengen genügend Spender-ejakulat für zahlreiche Tests vorhanden; Agglutinationstyp bekannt; hohe Sensitivität (42,46).

-Nachteile: Bedarf an frischem Spenderejakulat hervorragender Qualität; zeitraubende und subjektive Bewertung; unspezifische Agglutinationen (26); keine Information über die Immunglobulin-klasse der Spermatozoenantikörper.

2.3.3. SPERMATOZOEN-IMMOBILISATIONSTEST (SIT)

Originalbezeichnung: "Sperm Immobilization Test" nach ISOJIMA u. Mitarb. (78).

Inaktivierte Serum- bzw. Seminalplasmaverdünnungen werden mit frischem Spenderejakulat unter Zugabe von Meerschweinchenkomplement vermischt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wird der Anteil noch beweglicher Spermatozoen in einem Phasenkontrastmikroskop geschätzt. Beträgt er bei der Testprobe (mit Komplement) weniger als 50% der Kontrollprobe (ohne Komplement), ist das Resultat positiv, d.h. die Testprobe enthält komplement-abhängige immobilisierende Spermatozoenantikörper.

-Vorteile: relativ gute Korrelation zu klinisch relevanter Fertilitätsminderung bei Frauen (83).

-Nachteile: Bedarf an frischem Spenderejakulat hervorragender Qualität; zeitraubende und subjektive Bewertung; geringe Sensitivität; keine Information über die Immunglobulinklasse der Spermatozoenantikörper.

2.3.4. SPERMATOZOEN-ZERVIXMUKUS KONTAKT TEST (SCMC)

Originalbezeichnung: "Sperm Cervical Mucus Contact Test" nach KREMER und JAGER (93).

Die Indikation zum SCMC Test wird meist aus einem pathologischen Postkoitaltest nach Sims-Huhner gestellt. Beim SCMC Test wird in vitro die direkte Interaktion zwischen den Spermatozoen des

Ehemannes und dem ovulatorischen Zervikalschleim der Ehefrau untersucht. Auf einem Objektträger werden Samen und Zervikalschleim vorsichtig nebeneinander aufgetragen. Unter dem Mikroskop wird beurteilt, ob und wie viele Spermatozoen fähig sind, in den Zervikalschleim einzudringen. Ein besonders wichtiger Hinweis auf Spermatozoenantikörper ist das Auftreten des "shaking phenomena", bei dem die Spermatozoen wie festgeklebt an Ort und Stelle im Mukus zappeln.

Der Test kann erweitert werden durch die zusätzliche Verwendung eines fertilen Spendermukus und eines fertilen Spenderejakulats, mit deren Hilfe sich der Ursprungsort der Spermatozoenantikörper (Seminalplasma des Ehemannes oder Zervikalschleim der Ehefrau) ermitteln läßt.

-Vorteile: gleichzeitiger Nachweis von Spermatozoenantikörpern im Samen und Zervikalschleim des Ehepaares möglich; in vivo-ähnliche Verhältnisse und somit von Bedeutung bezüglich der klinischen Relevanz der nachgewiesenen Spermatozoenantikörper.

-Nachteile: hoher organisatorischer Aufwand; subjektive Bewertung; Immunglobulinklasse der Spermatozoenantikörper unbekannt; zum Screening ungeeignet.

2.3.5. HETEROLOGER OVUMPENETRATIONSTEST (HOP)

Originalbezeichnung: "Hamster Ova Test" nach YANAGIMACHI u. Mitarb. (168); neuerdings "Gamete-Membrane-Fusionstest" (WHO).

Nach dem Abtöten von Goldhamstern, die mit Hormonen zur Ovulation mehrerer Eier gleichzeitig stimuliert worden sind, werden die freipräparierten Eier durch Hyaluronidase und Trypsin vom Cumulus oophorus und der Zona pellucida befreit. Spenderspermatozoen werden mit Patientenserum vorinkubiert und anschließend für zwei Stunden bei 37 °C mit den Hamstereiern zusammengebracht. Nach dem Auswaschen nicht gebundener Spermatozoen zählt man die penetrierten ("befruchteten") Eier und die eingedrungenen bzw. daran haftenden Spermatozoen. Liegt die Zahl der penetrierten Eier beim

Testserum unter 15% des Spermatozoenantikörper-negativen Kontrollserums, so enthält das Testserum vermutlich Spermatozoenantikörper, die die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen reduziert haben (3).

-Vorteile: relativ objektive Bewertung möglich.

-Nachteile: sehr aufwendig; Immunglobulinklasse der Spermatozoenantikörper unbekannt; zum Screening ungeeignet.

2.3.6. INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZTECHNIK (IFT)

Originalbezeichnung: in diesem Zusammenhang keine; für den Nachweis von Spermatozoenantikörpern wurde die indirekte Immunfluoreszenztechnik u.a. von HANSEN und HJORT (62) beschrieben.

Auf einem Objektträger ausgestrichene Spermatozoen werden entweder unbehandelt oder nach Methanolfixierung mit Testserum inkubiert. Spermatozoenantikörper, sofern vorhanden, binden an verschiedene Regionen des Spermatozoons (Akrosom, postnukleäre Region, Schwanz etc.) und bleiben auch während der nachfolgenden Waschvorgänge haften.

Nach Zugabe fluoreszenzgekoppelter Anti-Humanglobuline und einer etwa dreißigminütigen Inkubationszeit werden die Spermatozoenausstriche unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

-Vorteile: genaue Lokalisation von Spermatozoenantigenen möglich; wertvolle Methode zur Charakterisierung monoklonaler Spermatozoenantikörper (76); Immunglobulinklasse der Spermatozoenantikörper bekannt.

-Nachteile: Entfernung oder Alteration von Spermatozoenantigenen durch Methanolfixierung; auch reaktiv mit Spermatozoenantigenen, die unter der Zelloberfläche liegen; Ergebnisse stark von der Qualität der Spermatozoen abhängig; als Screeningmethode ungeeignet (26,83); zum Teil unspezifisches Haften der fluoreszierenden Anti-Humanglobuline via IgG-Fc-Teil an der Spermatozoenmembran (21,121).

2.3.7. MAR-TEST

Originalbezeichnung: "Mixed Agglutination Reaction" nach JAGER u. Mitarb. (79).

Auf einem Objektträger wird neben einen Tropfen frischen Patientenejakulats ein Tropfen einer Erythrozytensuspension gegeben. Die rhesusfaktorpositiven Erythrozyten sind mit inkompletten Anti-D-Antikörpern (IgG) vorinkubiert. Nach Zugabe eines Tropfens spezifischen Anti-Human-IgG Serums werden die drei Tropfen gut gemischt und sofort unter dem Mikroskop betrachtet.

Falls Spermatozoenantikörper der Klasse IgG auf den Patientenspermatozoen vorhanden sind, binden die bivalenten Anti-Human-IgG-Antikörper sowohl an die IgG-Spermatozoenantikörper als auch an die IgG-Rhesusfaktorantikörper auf den Erythrozyten. Die daraus resultierenden Spermatozoen-Erythrozytenagglutinate werden nach Größe und Zahl der beteiligten Spermatozoen beurteilt.

Statt der relativ großen Erythrozyten können auch kleine IgG- oder IgA-beschichtete Kunststoffpartikel (Latex, Polyacrylamid) verwendet werden, die eine genauere Lokalisation der Antikörper auf den Spermatozoen erlauben (24).

-Vorteile: schnell und einfach durchführbar; vom geringen Aufwand her als Screeningmethode geeignet.

-Nachteile: subjektive Bewertung; Spermatozoenantikörper können nur auf motilen Spermatozoen nachgewiesen werden; keine Antikörperbestimmungen im Serum des Patienten möglich; keine Mehrfachbestimmungen möglich, da frisches Patientenejakulat gebraucht wird.

2.3.8. ENZYMMUNOASSAY (ELISA)

Originalbezeichnung: "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)"; für den Nachweis von Spermatozoenantikörpern erstmals beschrieben von RAJGOPAL und RAO (120).

Das Prinzip eines ELISA entspricht weitgehend dem der seltener verwendeten Radioimmunoassays zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern (111).

Spenderspermatozoen werden als Antigene fest an die Näpfe von Mikrotiterplatten adsorbiert, so daß sie nicht abwaschbar sind (Abb.1-1). Serum-, Seminalplasma- oder Zervikalschleimverdünnungen infertiler Patienten werden in die Näpfe pipettiert und 90 Minuten bei 37 °C inkubiert (Abb.1-2).

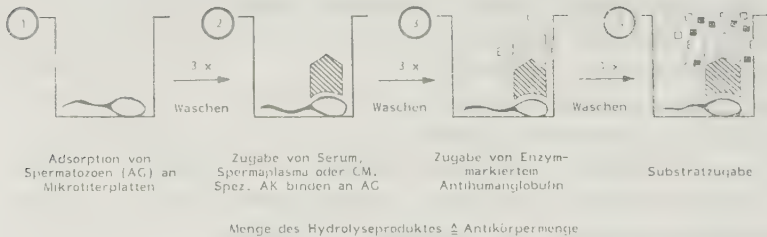


Abbildung 1. Prinzip des ELISA zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern

Legende: AG = Antigen; AK = Antikörper; CM = Zervikalschleim.

Nach gründlichem Entleeren und Auswaschen der Platten, bei dem nur Spermatozoenantikörper an den Spermatozoen haften bleiben, werden Anti-Human IgG-, IgA- oder IgM-Antikörper zugegeben. Die Anti-Humanglobuline, die mit einem Enzym gekoppelt sind, binden an die Spermatozoenantikörper (Abb.1-3).

Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C wird gründlich gewaschen und eine farblose Substratlösung zugegeben (Abb.1-4).

Das am zweiten Antikörper gebundene Enzym wandelt das Substrat in ein farbiges Produkt um, das nach 30-minütiger Inkubation (37 °C) photometrisch gemessen wird.

Je höher die optische Absorption, desto mehr Spermatozoenantikörper waren in der Testprobe enthalten.

-Vorteile: kein frisches Spenderejakulat nötig; monatelange Lagerung vorbereiteter Platten möglich; schnelle und objektive Messung durch Multiskan-Photometer; über hundert Proben pro Tag untersuchbar; geringer Materialverbrauch durch Mikromengen; sehr empfindlich; Immunglobulinklasse der Spermatozoenantikörper durch spezifische Antiseren bekannt; gleichzeitige Messung von agglutinierenden, immobilisierenden und die Befruchtungsfähigkeit senkenden Antikörpern möglich (2,162).

-Nachteile: keine Aussage über die Effekte der Spermatozoenantikörper; zum Teil falsch-positive Ergebnisse durch zirkulierende Immunkomplexe (163); klinische Relevanz der mit der ELISA-Technik gefundenen Antikörper noch wenig untersucht.

2.4. HÄUFIGKEIT VON SPERMATOZOENANTIKÖRPERN BEI INFERTILEN MÄNNERN

Seit WILSON (159) und RUMKE (123) erstmals auf die Möglichkeit der Autosensibilisierung gegen Ejakulatbestandteile hingewiesen haben, wurde eine große Zahl von Studien durchgeführt, um die Häufigkeit von Spermatozoenantikörpern in verschiedenen Untersuchungsgruppen zu ermitteln (s.a. Tab.4).

Tabelle 4. Vorkommen von Spermatozoenantikörpern bei infertilen Männern

Autor	Untersuchte Kollektive	S/SP	n	SA-Test	SA-Prävalenz
Rumke u. Hellinga (128)	Fertile Männer M. aus infertilen Ehen	S S	416 2015	GAT	0% (≥ 32) 3%
Schill et al. (132)	M. aus infertilen Ehen	S	278	GAT	1% (≥ 2)
Fjällbrandt (38)	Männliche Blutspender Fertile Männer M. aus infertilen Ehen	S S S	500 500 400	GAT	1% (≥ 64) 1% 4%
Husted (72)	Männliche Blutspender M. aus infertilen Ehen	S S	207 657	GAT	4% (≥ 4) 7%
Francavilla et al. (41)	M. aus infertilen Ehen " "	S SP	159 159	TAT	10% (≥ 32) 6% (≥ 4)
Hargreave et al. (63)	Fertile Männer M. mit Geschlechtskrankh. M. aus infertilen Ehen	S S S	151 217 645	TAT	1% (≥ 32) 3% 13%
Maucher et al. (106)	Fertile Männer Unerklärbar infertile M.	S S	25 35	IFT	0% (≥ 1) 14%
Wall et al. (156)	Männliche Blutspender M. mit Azoo-/Oligospermie	S S	100 63	IFT	5% (≥ 10) 21%
Zanchetta et al. (171)	M. aus infertilen Ehen " "	S SP	94 61	ELISA	13% (≥ 64) 11% (≥ 4)
Witkin u. Toth (161)	Fertile Männer M. mit bakt. Samenwegsinf. Prostatitis/Urethritis Patholog. Spermogramm Spontanagglutination d. Sp.	SP SP SP SP SP	21 29 17 33 6	ELISA	5% (≥ 10) 48% 47% 33% 100%

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; S = Serum; SP = Seminalplasma;
 Sp. = Spermatozoen; SA-Titer = in Klammern ();
 GAT = Gelatine-Agglutinationstest; TAT = Objektträger-Agglutinations-
 test; IFT = Immunfluoreszenztest; ELISA = Enzymimmunoassay.

Dabei ergaben sich in Abhängigkeit von den Selektionskriterien - fertile Männer, infertile Männer, Männer mit Oligo- und Azospermie, Männer mit unerklärbarer Sterilität, vasktomisierte Männer - sehr unterschiedliche Ergebnisse, die nur schwer miteinander vergleichbar sind. Des weiteren wird ein direkter Vergleich der Spermatozoenantikörperprävalenzen auch durch die Anwendung unterschiedlicher Testmethoden stark relativiert.

Bei der Auswertung der ihm im Jahre 1969 zugänglichen Literatur ermittelte GÜNTHER (57) unter 3750 beschriebenen Fällen bei 280 Männern (7,5%) Spermatozoenagglutinine im Serum.

Neuere Untersuchungen unausgewählter infertiler Männer ergeben in etwa 10% der Fälle Spermatozoenantikörper im Serum, wobei der Anteil hochtitriger und damit behandlungsbedürftiger Fälle unter 5% liegen dürfte (41,58,69,71,170).

Über das Vorkommen von Spermatozoenantikörpern im Seminalplasma gibt es weit weniger Berichte. Die wohl meist lokal sezernierten Antikörper dürften in weniger als 10% der infertilen Männer zu finden sein (41,170).

In Tab.4 sind die Ergebnisse einiger Arbeiten dargestellt. Nicht berücksichtigt wurden Untersuchungen über vasktomisierte Männer und homosexuelle Männer, da bei ihnen keine Infertilitätsprobleme bestehen. Wie schon erwähnt, liegen bei 50-60% der Vasktomisierten Serumantikörper gegen Spermatozoen vor (10,100,117,131). Unter den homosexuellen Männern wurden je nach Auswahl zum Teil sogar in 50-70% der Fälle zirkulierende Spermatozoenantikörper gefunden (107,160). Die Gründe für das häufige Vorkommen von Spermatozoenantikörpern in diesen Gruppen sind in den Kapiteln 2.2.1. und 2.2.5. beschrieben.

2.5. THERAPIE DER IMMUNOLOGISCHEN INFERTILITÄT DES MANNES

2.5.1. GLUKOKORTIKOIDE

Da Spermatozoenantikörper ein immunologisches Problem darstellen, bieten sich als Therapieversuch immunsuppressiv wirkende Pharmaka an. Hierbei finden neben Substanzen wie Azathioprin (Imurek^R, 92) vor allem Glukokortikoide und ihre synthetischen Derivate breitere Anwendung. Glukokortikoide hemmen die Tätigkeit von Makrophagen, schwächen die komplementvermittelte Zytotoxizität und steigern den IgG-Katabolismus (28,35).

SHULMAN (141) wendete 1976 erstmals eine kurzdauernde, hochdosierte Kortikosteroidtherapie bei einem Patienten mit Spermatozoenantikörpern an (96 mg Methylprednisolon tgl. vom 21.-28. Tag des Menstruationszyklus der Ehefrau). Die Spermatozoenantikörpertiter im Serum und Seminalplasma des Mannes fielen innerhalb von drei Wochen ab und die Ehefrau wurde während des folgenden Zyklus schwanger.

HENDRY u. Mitarb. (66) behandelten nach dem gleichen Schema 45 immunologisch-infertile Männer (mit durchschnittlich mehr als fünf Jahre währendem Kinderwunsch) und erzielten innerhalb von sechs Monaten bei 14 Ehepaaren (31%) Schwangerschaften.

SHULMAN u. SHULMAN (140) bewirkten bei 71 immunologisch-infertilen Männern mit dieser Therapie innerhalb von 12 Monaten 31 (44%) Schwangerschaften der Ehefrauen.

Typische Kortikosteroidnebenwirkungen wie z.B. gastrointestinale Störungen, Ödeme, Hypertension, Gliederschmerzen, Akne und Stimmungsschwankungen waren bei HENDRY u. Mitarb. (66) in 26% und bei SHULMAN u. SHULMAN (144) in 16% leichter Natur. In 6% bzw. 2% der Fälle traten schwere Kortikoidnebenwirkungen wie z.B. Femurkopfnekrose auf.

Daß auch eine geringere Kortikoiddosis noch Wirkung hat, zeigt eine Studie von ALEXANDER u. Mitarb. (8). Sie erzielten mit siebentägiger Gabe von je 60 mg Prednison unter 19 immunologisch-

infertilen Männern in sieben Fällen (37%) Schwangerschaften der Ehefrauen. In der Kontrollgruppe von 25 unbehandelten Männern traten dagegen nur in 12% der Fälle Schwangerschaften ein.

Ein anderes Therapieschema besteht aus der mehrmonatigen kontinuierlichen Einnahme niedrigdosierter Kortikosteroide (unter 15 mg Prednison pro Tag). Jedoch schnitt bei HENDRY u. Mitarb. (67) diese Art der Therapie mit nur 11% Schwangerschaften wesentlich schlechter ab als die hochdosierte Kurzzeittherapie mit 31% Erfolgsquote.

2.5.2. ANDERE THERAPIEMÖGLICHKEITEN

Je nach Pathogenese der immunologischen Infertilität des Mannes, bieten sich neben der Kortikoidtherapie noch andere, z.T. spezifischere Behandlungsmöglichkeiten an.

So kann es allein durch die antibiotische Sanierung chronischer urogenitaler Infektionen (meist Prostatitis) zu einem signifikanten Abfall der Spermatozoenantikörpertiter kommen (39).

Mißbildungen wie Nebenhodenzysten sollten chirurgisch korrigiert werden (132).

Sind die Spermatozoen des Mannes unfähig, den Zervikalschleim der Ehefrau zu durchdringen, kann diese Barriere durch eine intrauterine Insemination umgangen werden. Beim Vorliegen von Spermatozoenantikörpern im Zervikalschleim der Ehefrau kann dieser durch eine Östrogentherapie bei der Frau dünnflüssiger und damit besser penetrierbar gemacht werden (74).

Noch im experimentellen Stadium befinden sich Versuche, die Spermatozoen des Patienten durch in vitro-Absorption, Verdünnung oder Waschung vor Spermatozoenantikörpern zu schützen bzw. zu befreien (85,142). Bisher waren diese Bemühungen jedoch entweder unwirksam oder die Spermatozoen litten derart unter den Prozeduren, daß sie anschließend nicht mehr befruchtungsfähig waren.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. ZIELSETZUNG

Die eigenen Untersuchungen gliedern sich in einen experimentell-methodischen und einen klinischen Teil.

Im experimentellen Teil sollten die optimalen Testbedingungen eines Enzymimmunoassays (ELISA) zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern ermittelt werden. Darüberhinaus sollte der ELISA durch vergleichende Untersuchungen möglichst genau hinsichtlich Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit charakterisiert werden.

Im klinischen Teil der Arbeit galt es, Prävalenzen von Spermatozoenantikörpern in verschiedenen Kollektiven zu ermitteln und die dabei gefundenen Spermatozoenantikörper-positiven Seren und Seminalplasmen durch weitere laborchemische Untersuchungen genauer zu charakterisieren. Des weiteren sollten die Ergebnisse mit den klinisch-anamnestischen Daten der Patienten korreliert werden, um ein möglicherweise vorhandenes gemeinsames Auftreten von Spermatozoenantikörpern und klinischen Phänomenen aufzudecken.

Von besonderem Interesse war neben den andrologischen Patienten eine Gruppe homosexueller Männer, da von homosexuellen Sexualpraktiken wie z.B. Analverkehr Rückschlüsse auf die Pathogenese der Spermatozoenantikörper gezogen werden können.

Außerdem besteht in dieser Gruppe möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem häufigen intestinalen Kontakt mit immunsuppressivem Humansperma und dem erworbenen Immundefektsyndrom AIDS (107).

3.2. MATERIAL

3.2.1. SEREN

Die Seren wurden nach Punktion einer Armvene durch Abzentrifugation der zellulären Bestandteile gewonnen und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Seren der homosexuellen Männer wurden aus Sicherheitsgründen vor dem Einfrieren durch Erhitzen inaktiviert (56 °C, 30 min).

3.2.2. SEMINALPLASMEN

Bei einer sexuellen Karenz von vier bis fünf Tagen wurden die durch Masturbation gewonnenen Ejakulate nach ihrer Verflüssigung durch das andrologische Routinelabor beurteilt (s.a. Kap.3.3.5.) und anschließend zentrifugiert (EPPENDORF MINIFUGE, 16000 x g, 3 min). Das als Überstand gewonnene Seminalplasma wurde bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.3. ZERVIKALSCHLEIME

Um die ovulatorischen Zervikalschleime mit der ELISA-Technik untersuchen zu können, mußte zunächst deren hohe Viskosität verringert werden.

Zwei verschiedene Methoden - Verdauung des Mukus durch das proteolytische Enzym Bromelin und Ultraschallbehandlung - wurden miteinander verglichen, um die für die ELISA-Technik geeignetere Mukus-Verflüssigungsmethode zu finden (s.a. Kap.3.3.6.).

3.2.4. UNTERSUCHUNGSGRUPPEN

Folgende Kollektive wurden mit der ELISA-Technik auf Spermatozoenantikörper untersucht:

1. 10 Seren und Seminalplasmen fertiler Männer, deren Frauen innerhalb der vorausgegangenen sechs Monate schwanger geworden waren (Alter: 26-35 Jahre; $\bar{x}$ = 31 Jahre)
2. 178 Seren und Seminalplasmen unausgewählter Männer, die zwischen Dezember 1982 und August 1983 die andrologische Abteilung der Universitäts-Hautklinik München wegen Fertilitätsproblemen aufgesucht hatten (18-46 Jahre; $\bar{x}$ = 33 Jahre)
3. 223 Seren unausgewählter Männer, die zwischen Dezember 1983 und Januar 1984 die dermatologischen Ambulanzen der Universitäts-Hautklinik München wegen dermatologischer oder venerologischer Probleme aufgesucht hatten (17-49 Jahre; $\bar{x}$ = 34 Jahre)
4. 89 Seren homosexueller Männer, die 1983 und 1984 luesserologisch abgeklärt wurden (17-50 Jahre; $\bar{x}$ = 33 Jahre).
5. 22 Seren nicht-homosexueller Männer mit Luesantikörpern (22-49 Jahre; $\bar{x}$ = 35 Jahre)
6. 2 Spermatozoenantikörper-positive WHO-Referenzseren, die uns freundlicherweise von Dr. T. Hjort, Universität Aarhus/Dänemark, zugesandt wurden.
7. 23 Seren und 29 Seminalplasmen, die im Rahmen der herkömmlichen immunologischen Fertilitätsdiagnostik mit dem Gelatine-Agglutinationstest untersucht worden waren.
8. 40 Seren und Zervikalschleime von Frauen mit Kinderwunsch, freundlicherweise von Dr. med. M. Littich und Dr. med. W. Bollmann zur Verfügung gestellt.

3.3. METHODEN

3.3.1. METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM SPERMATOZOENANTIKÖRPER-ELISA

Das Prinzip der ELISA-Methode ist in Kap. 2.3.8. dargestellt.

3.3.1.1. MIKROTITERPLATTEN

Die 13 x 8 cm großen Mikrotiterplatten tragen 96 Näpfe, die in zwölf Spalten und acht Reihen so angeordnet sind, daß sie durch eine Zwölfkanal-Mikropipette rasch gefüllt werden können.

Neben ihrer Reagenzglasfunktion dienen die transparenten Näpfe auch gleichzeitig als Küvetten, so daß sich das früher erforderliche Umfüllen bei photometrischen Messungen erübrigt.

Vier verschiedene Plattenarten wurden auf folgende Eigenschaften untersucht: Spermatozoenadsorption, Diskriminierungsfähigkeit zwischen Spermatozoenantikörper-positiven und -negativen Proben und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Die Platten waren entweder aus Polystyren (DYNATECH Lab., Denkendorf) oder aus Polyvinylchlorid (PVC) gefertigt. Die PVC-Platten (TITERTEK, Flow Lab., Meckenheim) trugen entweder eine positive oder negative Ladung, oder waren zusätzlich durch Ozonbehandlung aktiviert.

3.3.1.2. SPERMATOZOEN ALS ANTIGENE

Als Antigene im ELISA dienten Spermatozoen menschlicher Ejakulate, die im Rahmen von Fertilitätsuntersuchungen durch Masturbation gewonnen worden waren und normale Spermiogrammbefunde aufwiesen: $\geq 30 \times 10^6$ Sp./ml, $\geq 50\%$ Totalmotilität, $\geq 50\%$ normale Morphologie, keine Leukozyten, keine Agglomerationen.

Nach ihrer Verflüssigung wurden die Ejakulate mit PBS-Puffer (s.a. Kap.3.3.1.10.) bis auf ein Gesamtvolumen von 10 ml ergänzt und anschließend zentrifugiert ($400 \times g$, 5 min).

Der Überstand wurde abgegossen und der zelluläre Bodensatz in 10 ml PBS resuspendiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurden die Spermatozoen in 2 ml PBS bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

Um zu ermitteln, ob Spermatozoenantigene durch Einfrieren alteriert werden, wurden fünf Ejakulate nach dem Waschen geteilt und sowohl gefroren als auch ungefroren an die Mikrotiterplatten gebunden.

3.3.1.3 BESCHICHTUNG DER MIKROTITERPLATTEN

Zur Bestimmung der optimalen Antigendichte wurden gewaschene Spermatozoen mit PBS auf verschiedene Konzentrationen eingestellt: 2,5 , 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320×10^3 Sp./100 μl PBS.

Jeweils 100 μl wurden in die Näpfe der Mikrotiterplatten pipetiert. Um die Spermatozoen zu adsorbieren wurden die Platten bei $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert.

Im Gegensatz zu den PVC-Platten, die damit bereits gebrauchsfertig beschichtet waren, mußten die Polystyren-Platten noch ausgeklopft und mit jeweils 100 μl einer 0,25% Glutaraldehyd-PBS Lösung gefüllt werden. Nach 10 Minuten wurden die Polystyren-Platten entleert und dreimal mit 200 μl PBS pro Napf gewaschen. Abgesehen von einigen Platten, die zu Vergleichszwecken nicht eingefroren wurden, konnten alle Platten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu ihrem Gebrauch gelagert werden.

3.3.1.4. VARIATIONEN ZUM TESTABLAUF

Um die optimalen Testbedingungen zu ermitteln, wurden auf den positiv-aktivierten PVC-Platten folgende Variationen durchgeführt:

- Waschen der Näpfe: je einmal, zweimal oder dreimal mit 100, 150 oder 200 μ l PBS Tween; eine, fünf oder zehn Minuten Einwirkzeit.
- Beginn der Verdünnungsreihen: bei 1/4 bis 1/128.
- Napfmengen: je 50, 100 oder 200 μ l.
- Inkubationen: je 60, 90 oder 120 Minuten für Testproben und Antikörper-Enzymkonjugat; 20, 40 oder 60 Minuten für das Substrat; Inkubation bei Raumtemperatur (22 °C) oder bei 37 °C.
- Stoppen der enzymatischen Reaktion mit 50 μ l 1 N NaOH oder Verzicht darauf.

3.3.1.5. KONTROLLEN

Als Kontrollen dienten Näpfe, die keine Spermatozoen enthielten, und Näpfe, die mit PBS Tween statt mit Serum, Seminalplasma, Enzymkonjugat oder Substrat gefüllt waren.

Die acht Näpfe der Spalte 1 wurden statt mit Serum oder Seminalplasma mit PBS Tween gefüllt und dienten als Leerwert. Außerdem wurde auf jede Platte eine Spermatozoenantikörper-positive und -negative Referenzprobe als Standard aufgebracht.

3.3.1.6. PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT

Spermatozoenantikörper-positive und -negative Seren und Seminalplasmen wurden 1/32 in PBS Tween verdünnt und jeweils in 88 Näpfe einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Intraassay-Präzision bzw. -Reproduzierbarkeit errechnet sich aus den 88 Werten einer Probe auf einer Platte; die Interassay-Präzision ergibt sich aus den Extinktionswerten einer Probe, die an fünf verschiedenen Tagen auf verschiedenen Platten ermittelt wurden.

Als Maß für die Präzision steht der Variationskoeffizient (VK), der sich aus dem Mittelwert ($\bar{x}$) und der Standardabweichung (s) nach der Formel $VK = (s:\bar{x}) \times 100\%$ ergibt.

Die Reproduzierbarkeit der Methode (R) leitet sich von der Präzision (VK) ab: $R = 100\% - VK$ (nach ACKERMANN et al., 2).

3.3.1.7. EINFLUß DES KOMPLEMENTSYSTEMS

Um den Einfluß des Komplementsystems auf die ELISA-Technik zu untersuchen, wurden 15 Spermatozoenantikörper-positive und -negative Seren sowohl aktiviert (nicht erhitzt) als auch inaktiviert (56 °C, 30 min) getestet.

3.3.1.8. WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER PROBEN

Eine mögliche Minderung der Spermatozoenantikörperaktivitäten durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen wurde anhand von je zwei positiven und negativen Seren und Seminalplasmen untersucht.

3.3.1.9. VERGLEICH DES ELISA MIT ANDEREN SPERMATOZOENANTIKÖRPER-TESTS

Insgesamt 70 Seren und 55 Seminalplasmen wurden sowohl mit der ELISA-Technik als auch mit dem Gelatine-Agglutinationstest (GAT) nach KIBRICK U. MITARB. (87) getestet. Im ELISA wurden Seren mit Titern ≥ 64 und Seminalplasmen ≥ 8 als positiv gewertet, im Gelatine-Agglutinationstest waren positive Titer ≥ 8 bzw. ≥ 4 .

Außerdem wurden zwei Spermatozoenantikörper-positive WHO-Referenzseren im ELISA getestet, die durch das Labor von Prof. Dr. T. Hjort, Universität Aarhus/Dänemark, bereits mit dem Gelatine-Agglutinationstest, dem Objektträger-Agglutinationstest und dem Spermatozoen-Immobilisationstest untersucht worden waren.

3.3.1.10. PUFFERLÖSUNGEN

PBS (Tween) pH 7,4		Diethanolaminpuffer pH 9,8	
NaCl	8,00 g	Diethanolamin	97 ml
KH ₂ PO ₄	0,20 g	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,10 g
Na ₂ PO ₄ 2H ₂ O	1,44 g	NaN ₃	0,20 g
Aqua dest.	ad 1000 ml	Aqua dest.	ad 700 ml
(Tween 20	0,5 ml)	1 N HCl	ad pH 9,8
		Aqua dest.	ad 1000 ml

3.3.2. GELATINE-AGGLUTINATIONSTEST NACH KIBRICK

Das Prinzip des Gelatine-Agglutinationstests ist in Kap. 2.4.1. beschrieben.

3.3.2.1. DURCHFÜHRUNG DES GELATINE-AGGLUTINATIONSTESTS

Der Gelatine-Agglutinationstest wurde nach der Methode von KIBRICK u. Mitarb. (87) durchgeführt, wobei auch einige von SCHILL u. Mitarb. (132) beschriebene Variationen zur Anwendung kamen (z.B. Kapillarröhrchen statt Reagenzgläser).

Als Antigene wurden nur frische Spenderejakulate bester Qualität verwendet: $\geq 60 \times 10^6$ Sp./ml, $\geq 30\%$ progressiv bewegliche Spermatozoen bei $\geq 60\%$ Gesamtmotilität nach zwei Stunden, $\geq 60\%$ normale Morphologie, keine Leukozyten, keine Agglomerationen.

Etwa 60 Minuten post ejaculationem wird der die beweglichen Spermatozoen enthaltende Überstand des Ejakulats abgehoben und mit 0,9% NaCl auf 40×10^6 Sp./ml verdünnt. Das Sperma wird im Verhältnis 1:1 mit 10%iger frisch gekochter Gelatine-Kochsalzlösung (37 °C) vermischt und in Kapillarröhrchen ("Accupettes") aufgezogen.

Nach 2 x 60-minütiger Inkubation bei erst 37 °C, dann 22 °C wird das Ergebnis erstmals abgelesen. Am folgenden Tag werden die über Nacht bei 4 °C gelagerten Kapillarröhrchen nochmals beurteilt.

3.3.2.2. KONTROLLEN BEIM GELATINE-AGGLUTINATIONSTEST

Als Kontrollen dienen Testansätze, denen statt Serum oder Seminalplasma lediglich 0,9% NaCl-Lösung zugegeben wurde. Außerdem werden Spermatozoenantikörper-positive und -negative Referenzproben mitgetestet.

3.3.2.3. BEURTEILUNG DES GELATINE-AGGLUTINATIONSTESTS

Die Kapillarröhrchen werden im seitlichen Lichteinfall gegen einen dunklen Hintergrund abgelesen. Eine homogene Trübung der Sperma-Gelatine zeigt ein negatives Ergebnis an, Ausflockungen deuten auf agglutinierende Spermatozoenantikörper hin.

Der Titer ist das Reziprok der höchsten Serum- oder Seminalplasmaverdünnung die noch ein positives Ergebnis erbringt.

3.3.3. BESTIMMUNG DER IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN

Die Immunglobulinkonzentrationen der Seren wurden bei den nicht-homosexuellen Männern mit Hilfe der radialen Immundiffusion (TRI-Partigen-IgG und -IgM, BEHRING, Marburg) bestimmt, und bei den homosexuellen Männern nephelometrisch mit einem Autoanalyzer (BECKMAN ICS Analyzer II).

Die Immunglobulinkonzentrationen der Seminalplasmen wurden mit hochempfindlichen radialen Immundiffusionsplatten bestimmt (LC-PARTIGEN-IgA, -IgG und -IgM, BEHRING).

3.3.4. ANAMNESE UND KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN

Anamnese und körperliche Untersuchung der andrologischen Patienten erfolgten durch die Ärzte der andrologischen Spezialsprechstunde.

3.3.5. EJAKULATBEFUNDE DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN

Die Spermioogramme der andrologischen Patienten wurden durch erfahrene medizinisch-technische Assistentinnen des andrologischen Routinelabors nach SCHIRREN (134) durchgeführt.

Die Spermatozoendichte wurde in einer Zählkammer bestimmt, Motilitäten wurden geschätzt und pathologische Formen, tote Spermatozoen (Eosintest) und Leukozyten wurden durch Auszählung von jeweils 100 Zellen bestimmt.

Leukozyten konnten außerdem farbenzymatisch durch den kommerziellen Zyturtest (BOEHRINGER, Mannheim) semiquantifiziert werden.

3.3.6. VERFLÜSSIGUNG DER ZERVIKALSCHLEIME

3.3.6.1. VERFLÜSSIGUNG DURCH BROMELIN

Dem ovulatorischen Zervixmucus wird eine identische Menge PBS-Bromelinlösung zugegeben. Das Ananasstambromelin (SIGMA, E.C. 3.4.22.4.) wurde vorher in PBS so weit verdünnt, daß seine Aktivität 7 "gelatin digesting units" pro ml beträgt. Nach 10 Minuten ist der Zervikalschleim durch enzymatische Verdauung vollständig verflüssigt und kann im ELISA getestet werden (nach INGERSLEV und POULSEN, 75)

3.3.6.2. VERFLÜSSIGUNG DURCH ULTRASCHALL

Der Zervikalschleim wird 1:1 in PBS verdünnt und mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (BRANSON Sonifier) für 3×10 Sekunden beschallt und dadurch auf physikalischem Wege aufbereitet. Der verflüssigte Zervikalschleim kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Testung gelagert werden (nach VAN KOOIJ, 152).

3.3.7. BESTIMMUNG DER LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPER BEI DEN HOMOSEXUELLEN MÄNNERN

Die LAV/HTLV-III-Antikörper der 89 Homosexuellenseren wurden im Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in München getestet. Das Screening erfolgte mittels eines LAV/HTLV-III-Antikörper-ELISA (158), die Bestätigungsreaktion wurde anhand eines Immunfluoreszenztests durchgeführt (22).

3.3.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Instituts für Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Ludwig Maximilians-Universität München.

Neben der deskriptiven Basisstatistik (Mittelwert, Median, Standardabweichung etc.), kamen noch der χ^2 -Test, der Student's-t-Test und die lineare Korrelationsanalyse zur Anwendung.

3.4. ERGEBNISSE

3.4.1. ERGEBNISSE DER METHODISCHEN UNTERSUCHUNGEN ZUM SPERMATOZOENANTIKÖRPER-ELISA

3.4.1.1. MIKROTITERPLATTEN

Die Resultate der ELISA-Reaktionen und die mikroskopische Begutachtung der Napfböden zeigten, daß alle drei Arten der PVC-Mikrotiterplatten einen sehr hohen Prozentsatz an Spermatozoen fest binden können. Selbst durch die zahlreichen Waschvorgänge des ELISA wurden die Spermatozoen nicht entfernt. Dies war nicht der Fall bei den Polystyren-Platten, die ohne Glutaraldehydfixierung nur einen geringen Teil der Spermatozoen banden.

Die beste Diskrimination zwischen Spermatozoenantikörper-positiven und -negativen Proben ergab sich auf den positiv geladenen PVC-Platten und auf glutaraldehydbehandelten Polystyren-Platten (E pos. 1,350; E neg. 0,095). Ebenso war die Intra- und Inter-assay-Reproduzierbarkeit auf diesen Platten am größten.

Aufgrund dieser Ergebnisse und anderer, im Diskussionsteil erläutelter Punkte (Kap.4.1.2.), wurden alle nachfolgend beschriebenen Versuche mit positiv aktivierten PVC-Mikrotiterplatten (TITERTEK) durchgeführt.

3.4.1.2. SPERMATOZOEN ALS ANTIGENE

Beim Vergleich eingefrorener und nativer Spermatozoen eines Spenders ergaben sich keine unterschiedlichen Ergebnisse mit der ELISA-Technik. Identische Resultate wurden auch mit fünf Ejakulaten verschiedener Spender erzielt.

3.4.1.3. BESCHICHTUNG DER MIKROTITERPLATTEN

Wie Abb.2 zeigt, ist die Spermatozoen-Adsorptionskapazität der PVC-Platten so hoch, daß selbst mit so geringen Mengen wie 2.500 Spermatozoen pro Napf Spermatozoenantikörper-positive Proben deutlich von -negativen Proben zu unterscheiden sind. Um jedoch mit Sicherheit genügend Antigen zu haben, wurden die Näpfe der Mikrotiterplatten mit jeweils 100×10^3 Spermatozoen beschichtet. Die so präparierten Platten konnten mindestens 12 Monate bei -20°C gelagert werden, ohne daß sich gegenüber frischen, nicht eingefrorenen Platten Qualitätsverluste feststellen ließen.

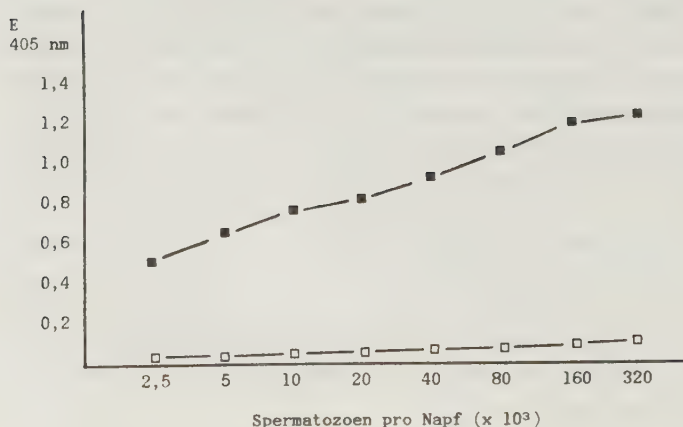


Abbildung 2. Optimale Spermatozoenkonzentration als Antigen

Legende: ■ — ■ = SA-positives Serum; □ — □ = SA-negatives Serum;

3.4.1.4. VARIATIONEN ZUM TESTABLAUF

Der Erfolg einer methodischen Variation ergab sich aus der Präzision der Ergebnisse und aus einem möglichst großen Extinktionsunterschied zwischen Spermatozoenantikörper-positiven und -negativen Referenzproben. Bei Gleichwertigkeit wurde die einfachere oder sparsamere Möglichkeit bevorzugt. Als optimale Testbedingungen für den ELISA wurden ermittelt:

- Waschen: 3 x 200 μ l PBS Tween (0,05%) mit je 5 Minuten Einwirkzeit.
- Probenverdünnungen: Seren werden zum Screening 1/16, 1/32 und 1/64 verdünnt, Seminalplasmen 1/8, 1/16 und 1/32. Bei positivem Ergebnis werden die Proben bis zu einer Verdünnung von 1/4096 ausgetitert.
- Inkubationen: Seren, Seminalplasmen und Anti-Humanglobuline werden je 90 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Substratinkubation (37 °C, feuchte Kammer) kann ab 20 Minuten Dauer beliebig gestoppt werden, da sich dann die Extinktionsverhältnisse der Proben (E pos. zu E neg.) auch mit zunehmender Inkubationszeit nicht mehr verändern (Tab.5).
- Auf das Stoppen der enzymatischen Reaktion kann verzichtet werden, da nur Extinktionen innerhalb einer Platte direkt miteinander verglichen werden und die Messung einer Platte weniger als eine Minute beansprucht.

Tabelle 5. Einfluß der Substratinkubationszeit

Substratinkubation:		20 min	40 min	60 min
SA-positiv	E:	0,185	0,500	0,670
SA-negativ	E:	0,016	0,045	0,063
E neg. / E pos.	:	0,09	0,09	0,09

3.4.1.5. OPTIMALE DURCHFÜHRUNG DES SPERMATOZOENANTIKÖRPER-ELISA

Nach dem Auftauen werden die beschichteten Platten mit 200 μ l PBS Tween gewaschen. Tween 20 (SIGMA, Deisenhofen) verhindert, daß sich Immunglobuline aus den Testproben unspezifisch an die Wände der Näpfe anlagern und dadurch falsch-positive Ergebnisse verursachen.

In die gewaschenen Näpfe werden je 100 μ l Serum-, Seminalplasma- oder Zervikalschleimverdünnung pipettiert (Verdünnungsschritte ab 1/16, 1/8 oder 1/4; Doppelansätze) und 90 Minuten bei 37 °C in feuchter Kammer inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen werden 100 μ l Anti-Humanglobulin-Enzymkonjugat zugegeben (SIGMA, 1/1000 verdünnt). Die an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelten Ziegenantikörper sind je nach Bedarf gegen eine einzige Immunglobulinklasse oder polyvalent gegen humanes IgA, IgG und IgM gleichzeitig gerichtet.

Nach der zweiten Inkubation (90 min, 37 °C) wird dreimal gewaschen und je 100 μ l von dem Substrat p-Nitrophenolphosphat zugegeben (SIGMA, 1 mg/ml Diethanolaminpuffer).

Nach etwa 20 minütiger Substratinkubation (37 °C) wird die optische Dichte des gelben Reaktionsproduktes bei 405 nm in einem Achtkanal-Photometer (TITERTEK MULTISKAN MC) gemessen und automatisch ausgedruckt.

3.4.1.6. BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE

Eine Reaktion wird als Spermatozoenantikörper-positiv gewertet, wenn die Extinktion der Testprobe mehr als doppelt so hoch ist, wie die einer negativen Referenzprobe. Der Titer ist der Reziprokwert der höchsten Probenverdünnung, die noch ein positives Ergebnis erbringt (Abb.3).

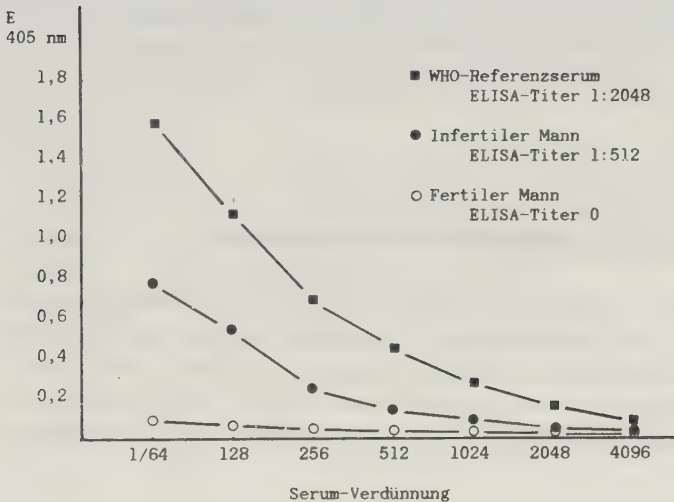


Abbildung 3. Typische Spermatozoenantikörper-Titrationskurven

3.4.1.7. KONTROLLEN

Tab.6 zeigt die Mittelwerte der Extinktionen von jeweils 8 Kontrollansätzen bzw. Referenzproben. Als Leerwert diente eine Spalte unbeschichteter Nöpfe mit 100 μ l PBS Tween.

Tabelle 6. Extinktionen verschiedener Kontroll- und Referenzproben

PBS Tween (Eichwert)	Nöpfe ohne Spermatozoen	PBS statt Serum/SP	PBS statt Ak-Enzym	PBS statt Substrat	SA-neg. Serum	SA-pos. Serum	SA-neg. SP	SA-pos. SP
0,000	0,019	0,030	0,021	0,017	0,092	1,350	0,065	0,780

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SP = Seminalplasma; Ak-Enzym = Antikörper-Enzymkonjugat;
SA-negative und -positive Seren und Seminalplasmen waren 1/32 verdünnt.

3.4.1.8. SPERMATOZOENANTIKÖRPER-TITRATIONSKURVEN

Wie auf Abb.4 zu sehen ist, gibt es zwischen den Titrationskurven von Seren und Seminalplasmen charakteristische Unterschiede. Während alle positiven Seren im Prinzip den dargestellten sigmoiden Kurvenverlauf zeigen, weisen 10 von 13 positiven Seminalplasmen in Verdünnungen zwischen 1/8 und 1/64 eine Art Prozoneneffekt auf.

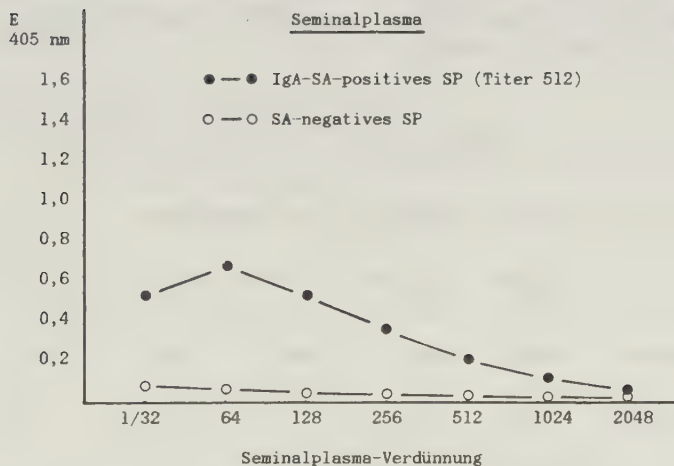
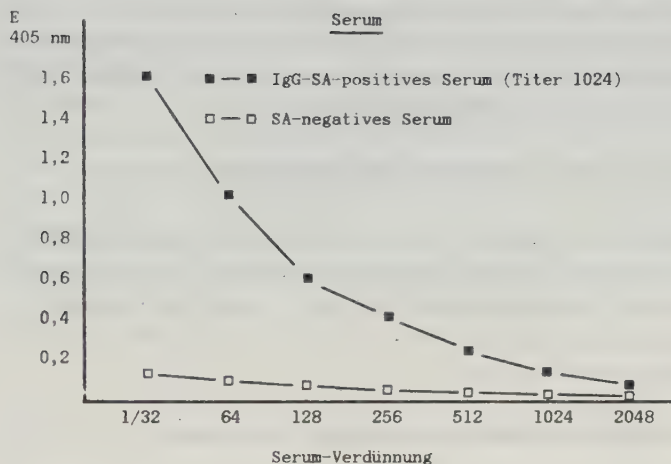


Abbildung 4. Typische Spermatozoenantikörper-Titrationskurven in Seren und Seminalplasmen

3.4.1.9. EINFLUSS DES KOMPLEMENTSYSTEMS

Die Ergebnisse von 15 Spermatozoenantikörper-positiven und -negativen Seren, die sowohl aktiviert als auch inaktiviert mit der ELISA-Methode getestet wurden, lassen keinen Einfluß des Komplementsystems auf die ELISA-Technik erkennen.

3.4.1.10. WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER PROBEN

Bis zu sechsmaliges Einfrieren und Auftauen von je zwei Spermatozoenantikörper-positiven und -negativen Seren und Seminalplasmen ergab keine Reaktivitätsminderung im ELISA. Selbst nach zehnmaligem Einfrieren lagen die Extinktionswerte noch bei 90% der nicht eingefrorenen Kontrollproben.

3.4.1.11. PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT DES ELISA

Die Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (VK), ergibt sich aus den in Tab.7 angegebenen Reproduzierbarkeitswerten (R) nach der Formel: $VK = 100\% - R$.

Tabelle 7. Reproduzierbarkeit des SA-ELISA mit verschiedenen Proben

Probe:	SA-neg. Serum	SA-pos. Serum	SA-neg. SP	SA-pos. SP
Intraassay Reproduzierbarkeit	90%	94%	88%	91%
Interassay Reproduzierbarkeit	74%	76%	72%	74%

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SP = Seminalplasma.

3.4.1.12. VERGLEICH DES ELISA MIT ANDEREN SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPERTESTS

TAB.8 zeigt, daß bei der Untersuchung zweier Spermatozoenantikörper-positiver WHO-Referenzseren mit verschiedenen Testmethoden die höchsten Titer mit der ELISA-Methode erzielt wurden. Der Enzymimmunoassay erwies sich um etwa 2 - 3 Titerstufen empfindlicher als der Gelatine-Agglutinationstest nach KIBRICK u. Mitarb. (87) oder der Objektträger-Agglutinationstest nach FRIBERG (46). Am wenigsten empfindlich war der Spermatozoen-Immobilisationstest nach ISOJIMA u. Mitarb. (78).

Tabelle 8. Untersuchung zweier WHO-Referenzseren mit verschiedenen SA-Tests

WHO-Serum	SIT (Isojima)	TAT (Friberg)	GAT (Kibrick)	ELISA
Nr. 108, SA-Titer:	16	32	4	128
Nr. 116, SA-Titer:	32	256	256	2048

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SIT = Spermatozoen-Immobilisationstest;
TAT = Objektträger-Agglutinationstest; GAT = Gelatine-Agglutinations-
test; ELISA = Enzymimmuncassay.

Wie auf Tab.9 zu sehen ist, kommt man mit der ELISA-Methode und dem Gelatine-Agglutinationstest (GAT) bei Spermatozoenantikörper-negativen Proben in 80-88% zum gleichen Ergebnis.

ELISA-reaktive IgM-Antikörper verursachten in 73% der Fälle positive Reaktionen im Gelatine-Agglutinationstest, im Gegensatz zu nur 43% der ELISA-reaktiven IgG-Antikörper. Noch geringer war die Korrelation bei den Seminalplasmen, wo nur 30% der ELISA-positiven Fälle auch im Gelatine-Agglutinationstest reaktiv waren.

Im Gelatine-Agglutinationstest positive Seren und Seminalplasmen waren nur in 50% der Fälle auch im ELISA reaktiv.

Tabelle 9. Vergleich des SA-ELISA mit dem Gelatine-Agglutinationstest (GAT)

Auswahlkriterium	n		n	Übereinstimmung ELISA-GAT
ELISA-neg. Seren	20	davon auch GAT-neg.	16	80%
ELISA-IgG-SA	11	davon auch GAT-pos.	5	45%
ELISA-IgM-SA	16	davon auch GAT-pos.	12	75%
ELISA-neg. SP	16	davon auch GAT-neg.	14	88%
ELISA-IgA-SA	3	davon auch GAT-pos.	0	0%
ELISA-IgA+IgG-SA	7	davon auch GAT-pos.	3	43%
GAT-neg. Seren	13	davon auch ELISA-neg.	11	85%
GAT-pos. Seren	10	davon auch ELISA-pos.	5	50%
GAT-neg. SP	25	davon auch ELISA-neg.	21	84%
GAT-pos. SP	4	davon auch ELISA-pos.	2	50%

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SP = Seminalplasma;

3.4.1.13. VERFLÜSSIGUNG DER ZERVIKALSCHLEIME

10 Zervikalschleime wurden geteilt und sowohl durch Bromelin als auch durch Ultraschall verflüssigt. Die anschließende Testung im ELISA ergab bei 9 Proben übereinstimmend Spermatozoenantikörper-negative Ergebnisse. Zervikalschleim Nr.5 zeigte nach Bromelinverflüssigung ein negatives und nach Ultraschallverflüssigung ein Spermatozoenantikörper-positives Ergebnis (Abb.5).

Des weiteren wurden zwei Spermatozoenantikörper-positive WHO-Referenzseren mit beiden Methoden vorbehandelt. Während nach Bromelinbehandlung keine Antikörperaktivitäten mehr nachweisbar waren, waren beide Referenzseren nach Ultraschallbehandlung noch stark reaktiv im ELISA.

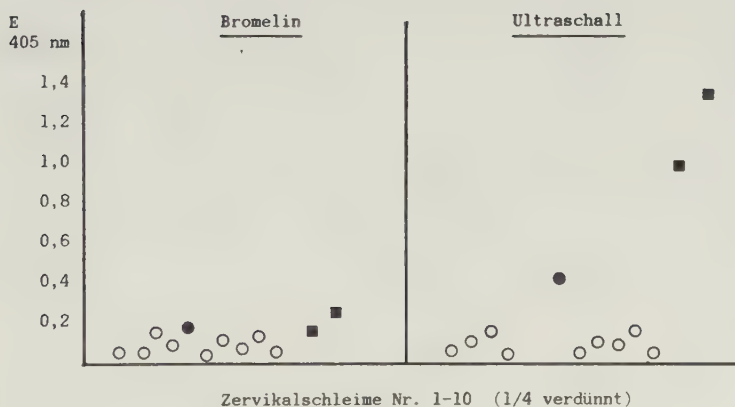


Abbildung 5. Verflüssigung von Zervikalschleim mit Bromelin und Ultraschall

Legende: CM = Zervikalschleim; Die WHO-Seren Nr.108 und Nr.116 (■) hatten im ELISA SA-Titer von 128 und 2048 (s.a. Tab.8);
 ○ = CM Nr.1-10; ● = CM Nr.5.

3.4.2. ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN

3.4.2.1. SPERMATOZOENANTIKÖRPER IN VERSCHIEDENEN UNTERSUCHUNGS-GRUPPEN

Wie auf Tab.10 zu sehen ist, bestehen zwischen den Untersuchungsgruppen zum Teil charakteristische Unterschiede der Spermatozoenantikörperprävalenzen.

Im Serum konnten keine Spermatozoenantikörper der Klasse IgA und im Seminalplasma keine der Klasse IgM nachgewiesen werden.

Tabelle 10. Spermatozoenantikörper in verschiedenen Untersuchungsgruppen

	Andrologische Patienten n = 178	Infertile Frauen n = 40	Homosexuelle Männer n = 89	Dermatologische Patienten n = 223	Lues- Patienten n = 22
Serum-IgG-SA n (%)	6 (3,4%)	2 (5,0%)	15 (16,9%)	4 (1,8%)	0
Serum-IgM-SA	10 (5,6%)	3 (7,5%)	10 (11,2%)	5 (2,2%)	1 (4,5%)
Serum-IgG+IgM-SA	1 (0,6%)	0	6 (6,7%)	0	0
Insgesamt Serum-SA	17 (9,6%)	5 (12,5%)	31 (34,8%) ^s	9 (4,0%)	1 (4,5%)
SP/CM-IgG-SA	0	2 (5,0%)			
SP/CM-IgA-SA	5 (2,8%)	4 (10,0%)			
SP/CM-IgA+IgG-SA	8 (4,5%)	0			
Insgesamt SP/CM-SA	13 (7,3%)	6 (15,0%)			

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SP = Seminalplasma; CM = Zervikalschleim;

^s - SA-Prävalenz signifikant höher als bei den dermatologischen Patienten ($p < 0,05$).

Nicht aufgeführt in der Tabelle ist die kleine Gruppe der fertilen Männer ($n = 10$), die weder im Serum noch im Seminalplasma Spermatozoenantikörper aufwiesen.

Das mit Abstand häufigste Vorkommen von Spermatozoenantikörpern fand sich mit 35% in den Seren der homosexuellen Männer, gefolgt von den infertilen Männern und Frauen (10% bzw. 13%). Bei 10 erwiesenermaßen fertilen Männern waren weder im Serum noch im Seminalplasma Spermatozoenantikörper vorhanden.

Männer mit primär dermato-venerologischen Problemen hatten in 4% der Fälle zirkulierende Spermatozoenantikörper; eine Gruppe von Luespatienten war in 5% der Fälle positiv.

Im Zervikalschleim wiesen 15% der infertilen Frauen, und im Seminalplasma 7% der infertilen Männer Spermatozoenantikörper auf. Spermatozoenantikörper im Serum und in den Genitalsekreten gleichzeitig hatte nur einer von insgesamt 29 positiven andrologischen Patienten (3%) und nur eine von 10 positiven infertilen Frauen (10%). Die Spermatozoenantikörpertiter rangierten im Serum von 64 - 4096, im Seminalplasma von 8 - 1024 und im Zervikalschleim von 4 - 32. Zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen ergaben sich keine relevanten Titerunterschiede.

3.4.2.2. ANAMNESE UND KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN

Wie Tab.11 zeigt, lag bei etwa 2/3 aller Infertilitätspatienten ein Samenwegsinfekt oder zumindest der Verdacht danach vor.

Im Vergleich zu der Spermatozoenantikörper-negativen Untergruppe findet man in den Antikörper-positiven Gruppen höheres Alter, länger bestehenden Kinderwunsch, weniger Kinder, häufiger Operationen im Genitalbereich und häufiger verkleinerte Hoden.

Tabelle 11. Anamnese und klinische Befunde der andrologischen Patienten

		Keine SA n = 149	Serum-IgG-SA n = 7	Serum-IgM-SA n = 11	SP-IgA/IgG-SA n = 13
Alter (Jahre)	$\bar{x} \pm s$ Median	33 $\pm$ 5 32	33 $\pm$ 5 32	37 $\pm$ 5 37	34 $\pm$ 6 35
Kinderwunsch seit (Jahren)	$\bar{x} \pm s$ Median	3,8 $\pm$ 3,4 2,0	4,1 $\pm$ 4,0 2,0	6,5 $\pm$ 4,3 6,0	4,4 $\pm$ 3,6 4,0
Kinder je gezeugt	n	14 (9%)	0	1 (9%)	0
Verdacht auf Samenwegsinf.	n	86 (58%)	4 (57%)	8 (73%)	9 (69%)
Lues (jetzt oder früher)	n	9 (6%)	0	0	1 (8%)
OP im Genitalbereich	n	24 (16%)	2 (29%)	1 (9%)	5 (38%)
Varikozele	n	21 (14%)	2 (29%)	2 (18%)	3 (23%)
Maldeszensus testis	n	7 (5%)	0	2 (18%)	1 (8%)
Ein oder zwei Hoden verkleinert	n	7 (5%)	3 (43%)	2 (11%)	0

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; $\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung;

SP = Seminalplasma; OP = Operation;

Aufgrund der sehr kleinen Untergruppen wurden keine Signifikanzen berechnet.

3.4.2.3. EJAKULATBEFUNDE DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN

Wie Tab.12 zeigt, bestehen zwischen der Spermatozoenantikörper-negativen Untergruppe und den Patienten mit IgM-Serum- und IgA/IgG-Seminalplasmaantikörpern keine wesentlichen Unterschiede der Ejakulatbefunde.

Tabelle 12. Spermiogrammbefunde der andrologischen Patienten

Ejakulatparameter		Keine SA n = 149	Serum-IgG-SA n = 7	Serum-IgM-SA n = 11	SP-IgA/IgG-SA n = 13
Volumen (ml)	$\bar{x} \pm s$ Median	$3,8 \pm 1,8$ 3,6	$4,0 \pm 2,7$ 3,4	$3,3 \pm 1,2$ 3,3	$3,8 \pm 2,3$ 3,3
pH-Wert		$7,8 \pm 0,4$ 7,8	$7,8 \pm 0,3$ 8,0	$8,0 \pm 0,2$ 8,0	$8,0 \pm 0,4$ 7,7
Spermatozoendichte ($\times 10^6/\text{ml}$)		67 ± 70 47	26 ± 27 14	65 ± 46 62	76 ± 59 55
Sp. insgesamt ($\times 10^6/\text{ml}$)		230 ± 287 162	89 ± 69 72	195 ± 123 185	205 ± 109 185
Progressivbewegl. Sp. (%)		18 ± 11 20	18 ± 6 20	17 ± 13 10	14 ± 10 10
Ortsbewegliche Sp. (%)		23 ± 10 20	31 ± 9 30	25 ± 10 20	22 ± 11 25
Unbewegliche Sp. (%)		59 ± 12 60	51 ± 7 50	58 ± 10 60	63 ± 15 60
Pathol. Sp.-Morphologie (%)		47 ± 15 47	54 ± 17 54	45 ± 18 43	46 ± 13 44
Tote Sp. (Eosin pos.) (%)		43 ± 15 42	41 ± 7 40	46 ± 17 50	43 ± 19 38
Sp.-Agglomerationen ($>30\%$ aller Sp.)	n	13 (9%)	0	0	2 (15%)
Leukozyten sichtbar (>5 pro Gesichtsfeld)	n	22 (15%)	1 (14%)	2 (18%)	2 (15%)
Zyturtest positiv (>10 Leukozyt./ul)	n	45 (30%)	3 (43%)	5 (45%)	4 (31%)

Legende: Sp. = Spermatozoen; SP = Seminalplasma; $\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung;
Aufgrund der sehr kleinen Untergruppen wurden keine Signifikanzen berechnet.

Während die Spermatozoendichte in diesen Gruppen weitgehend normal ist, liegt der Anteil der beweglichen Spermatozoen in allen Gruppen unter 50%, so daß von einer Asthenozoospermie gesprochen werden kann. Die Gruppe mit Spermatozoenantikörpern der Klasse IgG im Serum unterscheidet sich von den anderen Untergruppen vor allem durch eine wesentlich geringere Spermatozoendichte. In vier von sieben Fällen (57%) lag eine Oligozoospermie vor (unter 20 Mio Sp./ml).

3.4.2.4. IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN

3.4.2.4.1. IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN IN SPERMATOZOENANTIKÖRPER-POSITIVEN UND -NEGATIVEN SEREN

Wie auf Tab.13 zu sehen ist, lagen in den Seren der andrologischen Patienten alle IgG- und IgM-Gruppenwerte im Normbereich. Die Immunglobulinkonzentrationen waren in den Spermatozoenantikörper-positiven Gruppen nicht häufiger erhöht als in den negativen Gruppen. Bei den homosexuellen Männern wurden für diese Untersuchung nur die Immunglobulinwerte der LAV/HTLV-III-negativen angegeben, da bei den LAV/HTLV-III-positiven Männern aufgrund der unspezifischen polyklonalen B-Zellaktivierung (96) keine den andrologischen Patienten vergleichbaren Immunglobulinwerte zu erwarten waren.

Während sich die IgG-Serumkonzentrationen bei Spermatozoenantikörper-positiven und -negativen Homosexuellen nicht voneinander unterscheiden, weisen homosexuelle Männer mit Spermatozoenantikörpern der Klasse IgM signifikant höhere IgM-Serumspiegel auf ($\bar{x}$: 232 gegen 173 mg/dl; $p < 0,05$).

Sechs (43%) von 14 Homosexuellen mit IgM-Spermatozoenantikörpern hatten über den Normbereich hinaus erhöhte IgM-Werte im Serum (über 250 mg/dl).

Tabelle 13. Immunglobulinkonzentrationen in Seren mit und ohne Spermatozoenantikörper

SA im Serum: Untersuchte Fälle:	Andrologische Patienten			Homosexuelle Männer (nur LAV/HTLV-III-negative!)		
	Keine SA n=10	IgG-SA n=7	IgM-SA n=11	Keine SA n=42	IgG-SA n=18	IgM-SA n=14
Serum-IgG (mg/dl)	$\bar{x}$ 1266	1216	-	1221	1295	-
	s +382	+296	-	+319	+342	-
IgG über 1800 mg/dl	n 0	0	-	4(10%)	2(11%)	-
Serum-IgM (mg/dl)	$\bar{x}$ 178	-	202	173	-	232 ^s
	s +62	-	+83	+69	-	+69
IgM über 250 mg/dl	n 1(10%)	-	2(18%)	5(12%)	-	6(43%) ^s

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; SP = Seminalplasma; $\bar{x}$ = Mittelwert;

s = Standardabweichung; Normalwerte: IgG 800-1800 mg/dl; IgM 60-250 mg/dl;

^s = signifikant höher als in der SA-negativen Untergruppe ($p < 0,05$)

Die Abbildungen 6 und 7 (folgende Seite) zeigen, daß die IgG- und IgM-Spermatozoenantikörpertiter keine lineare Korrelation zu den IgG/IgM-Serumkonzentrationen aufweisen.

Es wird deutlich, daß erhöhte IgG- und IgM-Werte keine falsch-positiven ELISA-Ergebnisse verursachen.

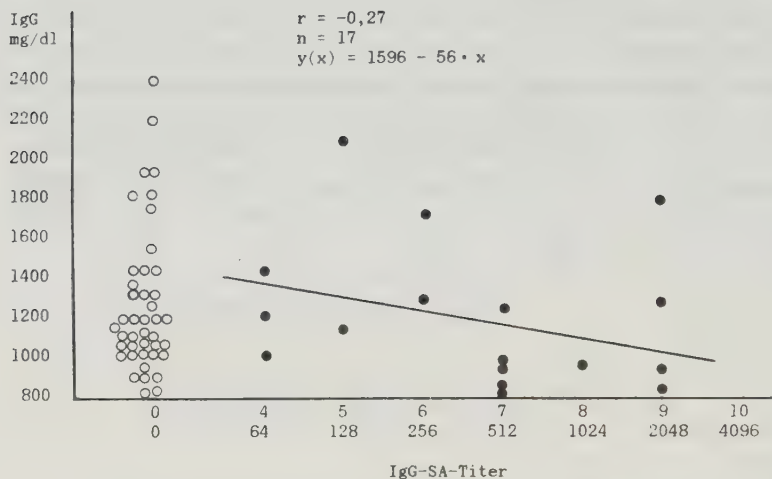


Abbildung 6. Korrelation zwischen Serum-IgG-Konzentration und IgG-SA-Titer

Legende: ○ = Spermatozoenantikörper-negative Seren;
● = IgG-Spermatozoenantikörper-positive Seren.

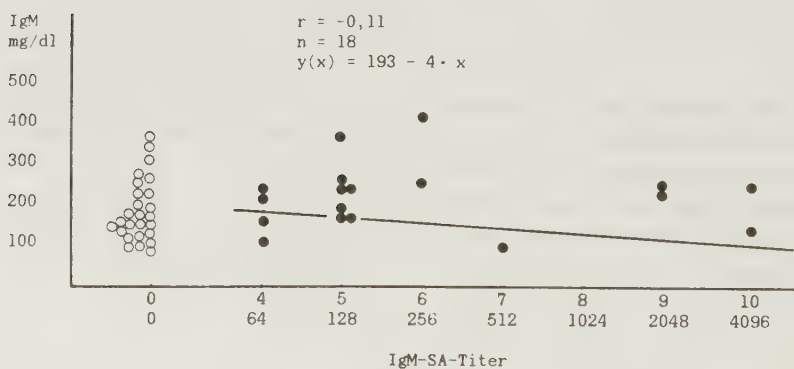


Abbildung 7. Korrelation zwischen Serum-IgM und IgM-SA-Titer

Legende: ○ = Spermatozoenantikörper-negative Seren;
● = IgM-Spermatozoenantikörper-positive Seren.

3.4.2.4.2. IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN DER SEMINALPLASMEN

Abb.8 zeigt, daß in den Seminalplasmen mit Spermatozoenantikörpern signifikant höhere lokale Immunglobulinkonzentrationen vorliegen als in den Seminalplasmen ohne Spermatozoenantikörper (IgG: 9,8 gegen 6,3 mg/dl; IgA: 3,2 gegen 1,7 mg/dl; $p < 0,05$).

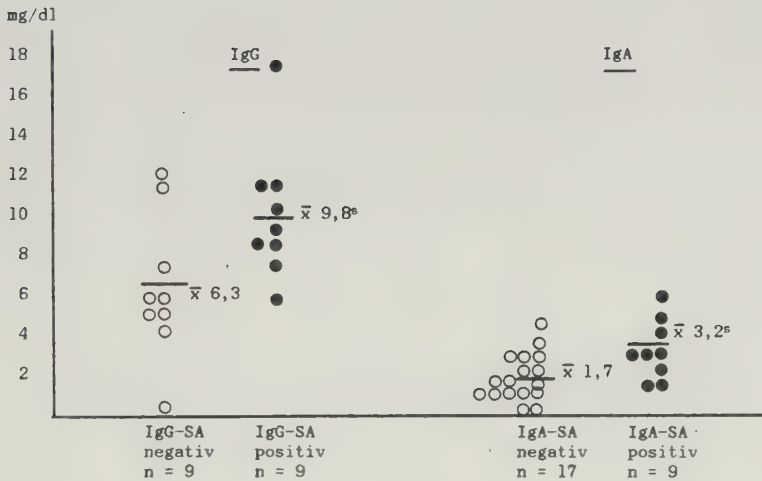


Abbildung 8. Immunglobulinkonzentrationen in Seminalplasmen

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; Immunglobulinkonzentrationen in SA-positiven Seminalplasmen sind signifikant erhöht ($p < 0,05$);
 O = SA-negative Seminalplasmen; ● = SA-positive Seminalplasmen.

3.4.2.5. LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPER BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN

Von 89 homosexuellen Männern waren 21 (24%) LAV/HTLV-III-positiv. Tab.14 zeigt, daß infizierte und nichtinfizierte Homosexuelle altersmäßig gleich verteilt sind ($\bar{x}$: 33 und 32 Jahre).

Die Serum-IgG, IgA und IgM-Konzentrationen sind bei den LAV/HTLV-III-infizierten Homosexuellen signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Tabelle 14. LAV/HTLV-III-Antikörper, Spermatozoenantikörper und Immunglobuline bei 89 homosexuellen Männern

	n	Alter (Jahre)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	SA-pos.
LAV/HTLV-III- positive M.	21 (24%)	33 $\pm$ 8	1911 ^s $\pm$ 623	356 ^s $\pm$ 252	231 ^s $\pm$ 121	5 (24%)
LAV/HTLV-III- negative M.	68 (76%)	32 $\pm$ 8	1241 $\pm$ 324	243 $\pm$ 87	186 $\pm$ 72	26 (38%)

Legende: SA = Spermatozoenantikörper; Ig-Normalwerte: IgG 800-1800 mg/dl, IgA 70-350 mg/dl, IgM 55-250 mg/dl;

^s = Werte signifikant höher als in der anderen Gruppe ($p < 0,05$).

3.4.2.6. BEZIEHUNG ZWISCHEN LAV/HTLV-III- UND SPERMATOZOEN-ANTIKÖRPERN BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN

LAV/HTLV-III-positive Homosexuelle weisen seltener Spermatozoen-antikörper auf als LAV/HTLV-III-negative Männer (24% gegen 38%). Daraus ergibt sich andersherum, daß Spermatozoenantikörper-positive Männer seltener LAV/HTLV-III-Antikörper tragen als Spermatozoenantikörper-negative Männer (16% gegen 28%; Abb.9).

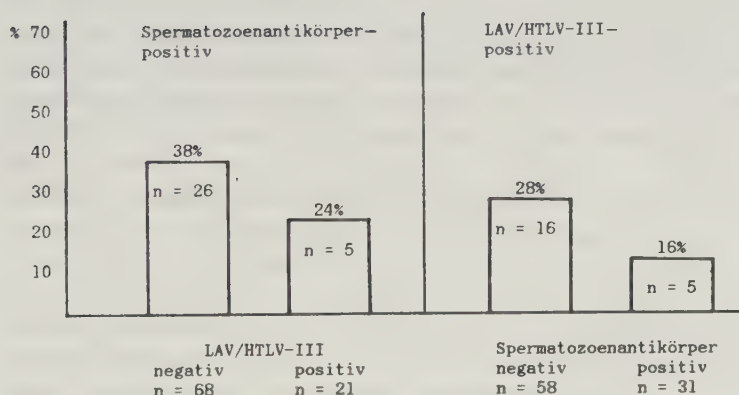


Abbildung 9. Beziehung zwischen LAV/HTLV-III- und Spermatozoen-antikörpern bei homosexuellen Männern

4. DISKUSSION

4.1. DISKUSSION DER METHODISCHEN UNTERSUCHUNGEN ZUM SPERMATOZOENANTIKÖRPER-ELISA

4.1.1. VORWORT

Seit der Erstbeschreibung im Jahre 1971 durch ENGVALL und PERLMAN (34) wurde die ELISA-Technik auf verschiedenen Gebieten der Laboratoriumsdiagnostik erprobt.

Vor allem dort, wo es gilt, in Körperflüssigkeiten kleinste Substanzmengen an Hormonen, Medikamenten, Tumormarkern oder spezifischen Immunglobulinen nachzuweisen, ist die ELISA-Technik von großem Nutzen (155).

Ein Enzymimmunoassay zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern wurde erstmals 1979 von den Indern RAJGOPAL und RAO (120) beschrieben. In den folgenden Jahren sind verschiedene experimentelle Variationen zur Methodik publiziert worden (2,5,116,162, 164,171).

Seit kurzem gibt es ein immer größer werdendes Angebot kommerzieller ELISA-Reagenzien, so daß die Methode zum einen weniger aufwendig und zum anderen besser standardisierbar wurde.

Um zu ermitteln, ob ein Enzymimmunoassay unter den gegebenen Voraussetzungen die herkömmlichen Spermatozoenantikörpertests ergänzen bzw. ersetzen kann, wurden mit den zur Verfügung stehenden Materialien verschiedene Testvariationen zur Methodik eines ELISA durchgeführt. Der so entwickelte Enzymimmunoassay zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern wurde anschließend durch vergleichende Untersuchungen genau hinsichtlich Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit charakterisiert.

4.1.2. MIKROTITERPLATTEN

Im Gegensatz zu den bisher üblichen Polystyren-Mikrotiterplatten, die nur mit Hilfe der chemisch sehr aktiven Substanz Glutaraldehyd fähig waren, Spermatozoen in ausreichendem Maße zu binden, konnte bei den von uns verwendeten Polyvinylchlorid-Platten auf eine Glutaraldehydfixierung und die dadurch erforderlichen Waschvorgänge verzichtet werden.

Selbst so niedrige Antigenkonzentrationen wie 2.500 Spermatozoen pro Napf lieferten gute Ergebnisse (Abb.2). Die Hauptursache der hohen Bindungskapazität der Platten dürfte die starke Affinität der Spermatozoen zum Material PVC sein, denn sowohl positiv- als auch negativ-geladene Platten ergaben gleichermaßen gute Spermatozoenadsorptionsquoten.

Mit Hilfe der in diesen Untersuchungen erstmals verwendeten Platten konnten Spermatozoenantigenalterationen durch aggressive Fixierungssubstanzen wie z.B. Glutaraldehyd (26) sicher ausgeschlossen werden. Darüberhinaus ist die Beschichtung der PVC-Platten wesentlich unkomplizierter als die der Polystyren-Platten, was eine erhebliche methodische Vereinfachung darstellt.

4.1.3. SPERMATOZOEN ALS ANTIGENE

Über den Einfluß von Gefriervorgängen auf Spermatozoenantigene gibt es kontroverse Berichte. Während ALEXANDER und KAY (7) durch Gefrierlagerung von Spermatozoen eine Minderung der Antigenität beobachteten, war dies in Untersuchungen von PHILLIP u. Mitarb. (118) nicht der Fall.

Auf den hier angewendeten ELISA sind diese Ergebnisse nur bedingt übertragbar, da in den vorliegenden Untersuchungen die Spermatozoen gewaschen und ohne Kryoprotektivum bei -20 °C in PBS gelagert wurden.

Da der Vergleich gefrorener und nicht gefrorener Spermatozoen und Platten keine Unterschiede der ELISA-Resultate ergab, war es möglich, aus einem Pool von etwa jeweils fünf verschiedenen Ejakulaten 50 Mikrotiter Platten zu beschichten.

Durch Lagerung bei -20°C konnten damit an die 5000 Einzelmessungen mit identischem Antigenmaterial durchgeführt werden.

4.1.4. KONTROLLEN

Die Ergebnisse der Näpfe ohne Spermatozoen als Antigene zeigen, daß dank des Detergens Tween 20 keine unspezifische Anlagerung von Immunglobulinen an das Plattenmaterial stattfand (Tab.6).

Wie Vorversuche ergaben, ist die im Seminalplasma in hohen Konzentrationen vorkommende saure Phosphatase auch im alkalischen Milieu des Diethanolamin-Substratpuffers (pH 9,8) äußerst aktiv. Es spricht daher für die Effektivität der Waschvorgänge, daß auch letzte Spuren der sauren Phosphatase entfernt werden. Dies wird durch die fehlende Reaktion des Substrats p-Nitrophenolphosphat bei Testung Spermatozoenantikörper-negativer Seminalplasmen nachgewiesen.

Die selbst nach stundenlanger Inkubation immer noch niedrigen Extinktionen solcher Näpfe, die nur Substrat enthielten, sprechen für eine hohe Eigenstabilität des p-Nitrophenolphosphat.

Das Verhältnis der Extinktionen Spermatozoenantikörper-positiver und -negativer Referenzproben von etwa 10:1 läßt im Falle hoher, und damit klinisch relevanter Titer, klare diagnostische Entscheidungen zu (Tab.6).

4.1.5. SPERMATOZOENANTIKÖRPER-TITRATIONSKURVEN

Vergleicht man die Formen von Serum- und Seminalplasmaitrationskurven, so ergeben sich charakteristische Unterschiede (Abb.4).

Während die Serumkurven mit dem steil abfallenden Teil der von VOLLER u. Mitarb. (155) beschriebenen sigmoiden Kurvenform gut vereinbar sind, läßt sich bei 10 von 13 Spermatozoenantikörperpositiven Seminalplasmen bis zu Verdünnungen von 1/32 und 1/64 zunächst ein Anstieg der Extinktionskurve beobachten. Das Verhalten der Seminalplasmakurven erinnert an den Prozoneneffekt bei Präzipitationsreaktionen (148).

Aufgrund der methodischen Unterschiede zwischen einem Enzymimmunoassay und einer Präzipitationsreaktion dürfte die Erklärung des "Seminalplasma-Prozoneneffekts" im ELISA jedoch nicht auf einem Antikörperüberschuß beruhen, sondern eher auf seminalplasmaspezifische, noch unbekannte Faktoren zurückzuführen sein.

4.1.6. PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT

Mit einer Intraassay-Reproduzierbarkeit von 91% ist ein hohes Maß an Präzision innerhalb einer Platte erreichbar. Die auf den ersten Blick niedrig erscheinende Interassay-Reproduzierbarkeit von 74% erklärt sich aus der angewendeten Berechnungsmethode nach ACKERMAN u. Mitarb. (2). Dabei werden die absoluten Extinktionswerte einer Testprobe verglichen, die an verschiedenen Tagen auf verschiedenen Platten getestet wurde.

Wenn aber, was vernünftiger erscheint, die Interassay-Reproduzierbarkeit danach bemessen wird, ob eine Probe an verschiedenen Tagen gleiche positive oder negative Ergebnisse erbringt, würde sie 88% betragen.

Die erreichten Präzisionswerte des ELISA liegen im Bereich der von anderen Autoren angegebenen Werte (2,5,116,164).

4.1.7. EINFLUß DES KOMPLEMENTSYSTEMS

Wie die Versuche mit aktivierten und inaktivierten Seren zeigen, werden die Ergebnisse des ELISA nicht von der An- oder Abwesenheit aktiver Komplementfaktoren beeinflusst.

Dies erscheint plausibel, da das Komplementsystem keinen Einfluß auf das Zustandekommen einer Antigen-Antikörper Bindung ausübt, sondern erst durch bereits bestehende Ag-Ak-Komplexe aktiviert werden kann (18,164).

4.1.8. WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen Spermatozoenantikörperhaltiger Seren und Seminalplasmen hatte nur geringfügigen Einfluß auf die Ergebnisse. So betrugen die Spermatozoenantikörperaktivitäten selbst nach zehnmaligem Einfrieren immer noch 90% des Nativwertes. Die relativ große Stabilität der Spermatozoenantikörper wurde auch von FRIBERG (47) beobachtet, der selbst nach zweiwöchiger Lagerung positiver Seren und Seminalplasmen bei Zimmertemperatur keinen Titerabfall feststellte.

4.1.9. VERGLEICH DES ELISA MIT ANDEREN SPERMATOZOEN- ANTIKÖRPER-TESTS

Die Untersuchung zweier positiver WHO-Referenzseren mit verschiedenen Spermatozoenantikörper-Testmethoden erbrachte die höchsten Titer für die ELISA-Methode. Sie war damit empfindlicher als der Spermatozoen-Immobilisationstest, der Gelatine-Agglutinationstest und der Objektträger-Agglutinationstest (Tab.8).

Die hohe Sensitivität erklärt sich aus dem Prinzip der Methode: im Gegensatz zu den herkömmlichen Spermatozoenantikörpertests findet im ELISA durch die fortlaufende enzymatische Reaktion eine Amplifikation des Ergebnisses "Antikörper haftet an Spermatozoon" statt.

So können mit diesem Test selbst kleinste Immunglobulinmengen nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit ist der eines Radioimmunoassays vergleichbar (111), ohne jedoch ähnliche sicherheitstechnische Probleme aufzuwerfen.

Von Bedeutung ist, daß der Vergleich mit dem Gelatine-Agglutinationstest nach KIBRICK u. Mitarb. (87) eine insgesamt nur mäßige Korrelation erbringt (Tab.9).

Durch das relativ seltene Auftreten der Spermatozoenantikörper war die Übereinstimmung bei Spermatozoenantikörper-negativen Testproben mit 80% erwartungsgemäß am höchsten. 73% der ELISA-IgM-positiven Seren verursachten Spermatozoenagglutinationen im Gelatine-Agglutinationstest, im Gegensatz zu nur 43% der ELISA-IgG-positiven Seren.

Bei ELISA-reaktiven Seminalplasmen (IgA und IgG) lag die Übereinstimmung zum Gelatine-Agglutinationstest sogar nur bei 30%.

Seren und Seminalplasmen, die im Gelatine-Agglutinationstest positiv waren, waren nur in 50% der Fälle auch im ELISA reaktiv.

Diese, in Übereinstimmung mit anderen Autoren (2,116,171) beobachteten Diskrepanzen, können verschiedene Ursachen haben: falsch positive Reaktionen im Gelatine-Agglutinationstest durch unspezifische β -Spermagglutinine in manchen Seren (20); relativ geringe Sensitivität des Gelatine-Agglutinationstests (21,42); das größere Antikörperspektrum des ELISA durch Erfassung auch nicht-agglutinierender Spermatozoenantikörper wie z.B. solcher, die im heterologen Ovumpenetratintest die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen nachweislich senken (25,108,169).

In den folgenden beiden Kapiteln sind weitere Möglichkeiten aufgezeigt, die beim Vergleich der ELISA-Technik mit anderen Spermatozoenantikörpertests zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

4.1.10. FALSCH-POSITIVE REAKTIONEN IM ELISA

Im Zusammenhang mit der ELISA-Technik wurden falsch-positive Reaktionen durch zirkulierende Immunkomplexe beschrieben, die sich über IgG-Fc-Teile unspezifisch an die Spermatozoenoberfläche anlagern können (163).

Eigene Versuche mit hitzeaggregiertem Human-IgG (AHG), das als Modell und Standard für zirkulierende Immunkomplexe dient, ergaben nur mit glutaraldehydfixierten Spermatozoen falsch-positive Reaktionen im ELISA.

Mit unfixierten Spermatozoen, wie sie in den vorliegenden Untersuchungen verwendet wurden, waren aggregierte Humanglobuline nicht reaktiv. Es kann also davon ausgegangen werden, daß zirkulierende Immunkomplexe in dem hier verwendeten ELISA keine falsch-positiven Ergebnisse verursachen.

Als weitere Fehlerquelle wird die Ausbildung unspezifischer Disulfidbindungen zwischen der Spermatozoenoberfläche und dem Fc-Teil monomerer Immunglobuline der Klasse IgG beschrieben (121).

Tatsächlich verursacht gereinigtes IgG (Cohn Fraktion II, SIGMA, 1mg/ml in PBS verdünnt) auch in unserem ELISA stark positive Reaktionen, die sich im IgG-Assay sogar sehr gut als Standard verwenden lassen.

Was jedoch den nicht gereinigten IgG-Anteil aus Testseren anbelangt, so konnte klar gezeigt werden, daß Serum-IgG-Konzentrationen bis zu 2500 mg/dl (normal: max. 1800 mg/dl) in dem hier verwendeten ELISA keine falsch-positiven Ergebnisse verursacht haben (Abb.6).

4.1.11. FALSCH-NEGATIVE RESULTATE IM ELISA

Falsch-negative Resultate im ELISA und allen anderen Testsystemen, die das Seminalplasma des Patienten untersuchen, wären dadurch denkbar, daß alle Spermatozoenantikörper zum Zeitpunkt der Zentrifugation des Ejakulats fest an die Spermatozoen gebunden sind und somit im Seminalplasma nicht nachweisbar wären; eine bisher von den meisten Autoren kaum berücksichtigte Fehlermöglichkeit.

Vergleichende Untersuchungen mit dem MAR-Test (79), der es ermöglicht, Immunglobuline auf den Patientenspermatozoen direkt nachzuweisen, könnten diese theoretische Fehlermöglichkeit ausschließen.

Auch böte sich die Erprobung eines direkten ELISA an, bei dem die gewaschenen Spermatozoen des Patienten auf die Mikrotiterplatten gebunden würden. Auf den Spermatozoen haftende Immunglobuline könnten durch Zugabe eines Anti-Human IgG-, IgA- oder IgM-Enzymkonjugats nachgewiesen werden.

Abschließend sei jedoch bemerkt, daß ähnlich dem Coombs-Test zum Nachweis von Anti-Erythrozyten Antikörpern, beim Vorliegen hoher Spermatozoenantikörpertiter wahrscheinlich immer ein gewisser Teil der Spermatozoenantikörper nicht spermatozoengebunden und damit im Seminalplasma nachweisbar ist.

4.1.12. LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES ELISA

Dank des Achtkanal-Multiskan Photometers war es möglich, die Extinktionen aller 96 Näpfe einer Platte innerhalb einer Minute zu messen und durch Ausdrucken zu dokumentieren.

120 Seren und Seminalplasmen können innerhalb eines Tages untersucht werden, wobei der größte Arbeitsaufwand in der Vorbereitung der Probenverdünnungen besteht.

Somit ist die ELISA-Technik die zur Zeit wohl leistungsfähigste Methode, um große Mengen an Seren, Seminalplasmen oder Zervikal-

schleimen auf Spermatozoenantikörper zu untersuchen (s.a. Tab.3). Darüberhinaus ist der Enzymimmunoassay äußerst empfindlich, objektiv in der Bewertung, gut reproduzierbar und problemlos durchzuführen.

4.1.13. VERFLÜSSIGUNG DER ZERVIKALSCHLEIME

Wie aus Abb.5 zu ersehen ist, verdaut das proteolytische Enzym Bromelin nicht nur visköse Zervixmukus-Glykoproteine (75), sondern auch Spermatozoenantikörper.

VAN KOOIJ (152) konnte durch elektrophoretische Auftrennung von Zervikalschleim zeigen, daß zuvor vorhandene Immunglobulinbanden nach Bromelinbehandlung nicht mehr nachweisbar waren. Das Enzym hatte die Immunglobuline durch papain- bzw. pepsinartige Spaltung in niedermolekulare Bruchstücke zerlegt (153,166).

Im Gegensatz dazu werden die Immunglobuline durch Ultraschallbehandlung nicht zerstört (152) und waren daher in unseren Untersuchungen auch nach der Verflüssigung des Mukus im ELISA nachweisbar (Abb.5).

Es ist deshalb außerordentlich wichtig, daß Zervikalschleim vor der Testung im ELISA durch Ultraschall verflüssigt wird, und nicht wie bisher üblich durch Bromelin.

4.2. DISKUSSION DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Vorausschickend zur Diskussion der klinischen Ergebnisse muß darauf hingewiesen werden, daß aufgrund der Vielzahl von Spermatozoenantikörper-Testmethoden (s.a. Kap.2.3.) und unterschiedlicher Patientenkollektive die Ergebnisse aus verschiedenen Arbeitsgruppen nur sehr bedingt vergleichbar sind.

Selbst bei identischem Material und Methoden werden in verschiedenen Laboratorien zum Teil stark differierende Resultate erzielt (WHO-Vergleichsstudie 1977, 21).

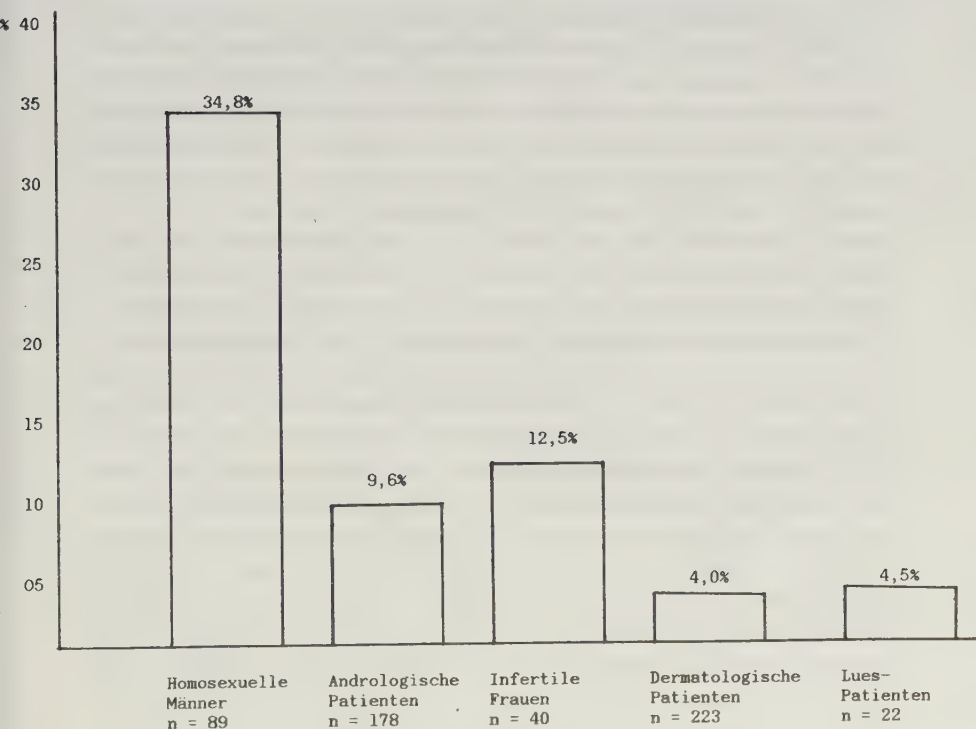


Abbildung 10. Vorkommen von Serum-Spermatozoenantikörpern in verschiedenen Kollektiven

4.2.1.1. SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI FERTILEN MÄNNERN

Bei keinem von 10 erwiesenermaßen fertilen Männern ließen sich Spermatozoenantikörper im Serum oder Seminalplasma nachweisen. Ob bei einer größeren Zahl fertiler Männer die Spermatozoenantikörperprävalenz ebenfalls 0% betragen würde, kann hier nicht beurteilt werden. Andere Arbeitsgruppen fanden in größeren Kollektiven fertiler Männer ebenfalls keine Spermatozoenantikörper mit klinisch relevanten Titern (Serum über 64, Seminalplasma: unbekannt; 106,128).

4.2.1.2. SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI DERMATOLOGISCHEN PATIENTEN

Betrachtet man die Gruppe der dermatologischen Patienten als eine Art Kontrollgruppe ohne bekannte Infertilitätsprobleme, so finden sich die von uns ermittelten 4% Serumantikörper in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen.

So ermittelten HUSTED und HJORT (69) mit dem Gelatine-Agglutinationstest unter 207 männlichen Blutspendern eine Spermatozoenantikörperprävalenz von 4%. WALL u. Mitarb. (156) fanden mit der Immunfluoreszenztechnik in 5% von 100 männlichen Blutspendern zirkulierende Spermatozoenantikörper.

In unseren Untersuchungen litten sechs der neun positiven dermatologischen Kontrollpatienten unter akuten Infektionen des Genitaltrakts wie z.B. Lues, Gonorrhoe oder Soorbalanitis. Da Entzündungen als mögliche Ursachen einer Spermatozoenantikörperbildung diskutiert werden (12,161), ist davon auszugehen, daß die Spermatozoenantikörperprävalenz in einer Kontrollgruppe ohne gesundheitliche Probleme deutlich unter 4% liegen dürfte.

4.2.1.3. SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI ANDROLOGISCHEN PATIENTEN

In den Seren unausgewählter andrologischer Patienten mit Fertilitätsproblemen wurden in 10% der Fälle IgG- und IgM-Spermatozoenantikörper gefunden (Tab.10, Abb.10). Die Titer lagen zwischen 64 und 4096. Spermatozoenantikörper der Klasse IgA konnten im Serum nicht nachgewiesen werden.

ZANCHETTA u. Mitarb. (171) ermittelten mit einem anderen Enzymimmunoassay unter 94 Seren infertiler Männer in 13% IgG- und IgM-Spermatozoenantikörper. 9% wiesen Titer von 4-16 auf und 4% Titer über 32. Zirkulierende Spermatozoenantikörper der Klasse IgA wurden auch in ihrer Untersuchung im Serum nicht nachgewiesen.

Im Seminalplasma der von uns untersuchten andrologischen Patienten wurden in 7% IgA- und IgG-Spermatozoenantikörper gefunden (Tab.10). Spermatozoenantikörper der Klasse IgM konnten in Übereinstimmung mit anderen Autoren (32,68,133) im Seminalplasma nicht nachgewiesen werden.

ZANCHETTA u. Mitarb. (171) fanden in 10% von 61 Seminalplasmen infertiler Männer IgA- und IgG-Spermatozoenantikörper und in einem Fall IgM-Antikörper. Da Immunglobuline der Klasse IgM im Seminalplasma normalerweise nicht oder nur in Spuren nachweisbar sind (32,68,133), erklären sich die Autoren den IgM-Befund mit einer Schädigung der testikulären Blut-Hoden-Schranke durch Orchitiden, die bei dem Patienten wiederholt abgelaufenen waren. Die von uns gefundenen IgA-Antikörper im Seminalplasma sind vermutlich vom sekretorischen Typ, da sie in keinem Fall gleichzeitig auch im Serum der Patienten nachweisbar waren.

Die Möglichkeit einer lokalen Antikörperbildung, die sich im Serum nicht widerspiegelt (47,80), unterstreicht die Wichtigkeit der Untersuchung von Zervikalschleim und Seminalplasma.

Nach gängiger Auffassung können Spermatozoenantikörper der Klasse IgG über die Prostata aus dem Serum ins Seminalplasma übertreten (127). Daher ist das Ergebnis, daß in keinem der 7 Fälle positiver IgG-Antikörper des Serums diese Antikörper auch im

Seminalplasma nachweisbar waren, scheinbar ungewöhnlich. Ebenso fanden sich in keinem der 8 Fälle von IgG-Antikörpern im Seminalplasma Spermatozoenantikörper im Serum des Patienten.

Bei der Interpretation dieser Befunde ist hilfreich, daß auch andere Autoren eine ähnliche Diskrepanz zwischen Serum und Seminalplasma beobachtet haben.

So konnten zwar in 50-60% der Seren vasektomierter Männer Spermatozoenantikörper nachgewiesen werden, in den Seminalplasmen der Vasektomierten waren jedoch nur in 3-4% der Fälle Spermatozoenantikörper vorhanden (6,11,51,98).

Diese Berichte, wie auch die von uns erhobenen Befunde, sprechen im Gegensatz zu den Mitteilungen anderer Autoren (40,45) gegen einen relevanten Spermatozoenantikörpertransfer vom Serum ins Seminalplasma. Ferner ist zu erwähnen, daß die Untersuchungen von RUMKE (127), auf die sich die gängige Antikörper-Transfertheorie vor allem stützt, nicht an Patienten mit Spermatozoenantikörpern vorgenommen wurden, sondern an gesunden Testpersonen. Es wurden lediglich die Immunglobulinkonzentrationen in Split-Ejakulaten und Seren gemessen, jedoch keine Spermatozoenantikörperuntersuchungen durchgeführt.

Außer durch die Prostata könnten Antikörper gegen Spermatozoen allerdings auch im Bereich des Nebenhodens vom Serum ins Seminalplasma übergehen. Hierfür sprechen tierexperimentelle Befunde von TUNG u. Mitarb. (150). Das würde auch erklären, daß bei Vasektomierten die häufig zu findenden Serumantikörper so selten im Seminalplasma nachzuweisen sind (6,11,51,98).

Andererseits sprechen gegen diese Hypothese die Ergebnisse von THOMAS u. Mitarb. (146), die unter 21 vaso-vasostomierten Männern keinen fertilitätsmindernden Einfluß von Serumantikörpern feststellten. So wiesen alle fünf angehenden Väter aus dem re-fertilisierten Kollektiv Spermatozoenantikörper im Serum auf. Im Gegensatz dazu hatte jedoch nur einer der fünf erwiesenermaßen fertilen Männer Spermatozoenantikörper im klinisch wichtigeren Seminalplasma.

4.2.1.4. HOMOSEXUELLE MÄNNER

4.2.1.4.1. SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN

Das mit Abstand häufigste Vorkommen von Spermatozoenantikörpern fand sich mit insgesamt 35% in den Seren der homosexuellen Männer (Tab.10, Abb.10).

Um auszuschließen, daß dieser Befund ein testbedingter Nebeneffekt der in 71% der Homosexuellen gefundenen Luesantikörper ist, wurde zusätzlich eine Gruppe von 22 nicht-homosexuellen Luespatienten untersucht. Nur ein Mann aus diesem Kollektiv (5%) hatte Spermatozoenantikörper im Serum, so daß die hohe Antikörperprävalenz unter den Homosexuellen nicht durch die hohe Zahl frischer und alter Luesfälle bedingt sein dürfte.

Als Erklärung dieses Phänomens bieten sich vielmehr die von vielen Homosexuellen ausgeübten Sexualpraktiken des Oral- und Analverkehrs an. Die Schleimhaut des inneren Anals besteht lediglich aus einem einschichtigen Zylinderepithel, das im Gegensatz zum mehrschichtigen Plattenepithel der Vagina beim Rektalverkehr leicht verletzt werden kann (107). Damit kommt es zum Kontakt zwischen Spermatozoen und Immunsystem, was aufgrund der hohen Antigenität der Spermatozoen in vielen Fällen zu einer Antikörperbildung führt (107,160). Neben dem häufigen Antigenkontakt könnten auch Infektionen wie z.B. die Rektalgonorrhoe durch eine Art Adjuvans-Effekt zur Spermatozoenantikörperbildung beitragen (12,160). MAVLIGIT u. Mitarb. (107) fanden unter 26 homosexuellen Männern, die regelmäßig passiven Analverkehr ausübten, in 19 Fällen (73%) Spermatozoenantikörper im Serum; dagegen wurden bei keinem der Homosexuellen, die ausschließlich aktiven Analverkehr ausübten, Spermatozoenantikörper nachgewiesen.

4.2.1.4.2. LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPER BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN

Die Untersuchung der Seren der homosexuellen Männer auf LAV/HTLV-III-Antikörper ergab, daß 21 der 89 Männer (24%) durch das Virus infiziert waren (Tab.14). Zwar zählen Homosexuelle bekanntermaßen zu der gefährdetsten Risikogruppe; es ist jedoch sehr bedenklich, daß bereits 1983/84 rund jeder vierte Münchner Homosexuelle mit fraglicher Luesinfektion als Auswahlkriterium für dieses Kollektiv LAV/HTLV-III-positiv war und somit Gefahr läuft, an AIDS zu erkranken.

Das erworbene Immundefektsyndrom, besser bekannt unter dem englischen Kürzel "AIDS" (acquired immune deficiency syndrome, 55), wird durch ein Retrovirus verursacht, das von seinen französischen Entdeckern (14) "lymphadenopathy associated virus, LAV" und von seinen amerikanischen Entdeckern (52) "human T-cell lymphotropic virus type III, HTLV-III" genannt wurde.

Nach Latenzzeiten von Monaten bis mehreren Jahren entwickelten bisher rund 20-30% der meist homosexuellen Virusträger klinische Symptome des AIDS-Syndroms bzw. seiner Vorstufen.

Man beobachtet zunächst relativ unspezifische Zeichen wie Nachtschweiß, Durchfälle, Gewichtsabnahme, Candidainfektionen und persistierende Lymphknotenschwellungen. Diese Symptome werden subsummiert unter den Bezeichnungen "lymphadenopathy syndrome, LAS", "AIDS-related complex, ARC" oder "pre-AIDS" (14,84,105).

Zum Teil gehen die unspezifischen Beschwerden in das manifeste Immundefektsyndrom AIDS über, das klinisch von schweren opportunistischen Infektionen wie z.B. Pneumocystis carinii Pneumonien und systemischen Candidainfektionen geprägt ist (55).

Bei etwa einem Viertel der Erkrankten (59) liegt das ansonsten sehr selten vorkommende Kaposi Sarkom vor. Das Kaposi Sarkom, das sich an der Haut und auch an inneren Organen manifestieren kann, ist durch eine maligne Proliferation von Kapillaren und Bindegewebszellen gekennzeichnet. An der Haut imponieren

braunrote bis bläulich-violette Makulae, die sich zum Teil in Knötchen und Knoten umwandeln können (23).

Laborchemisch ist ein klinisch manifester Immundefekt meist durch ein pathologisches Verhältnis von T-Effektor- (OKT4) zu T-Suppressorlymphozyten (OKT8) gekennzeichnet (91). Normalerweise liegt das OKT4/OKT8 Verhältnis über 1; bei vielen Erkrankten sinkt es jedoch auf unter 1 bzw. 0,5. Dies geht sowohl auf eine leichte Vermehrung der OKT8-Suppressorzellen als auch auf eine starke Verminderung der OKT4-Effektorzellen zurück (91).

Obwohl das LAV/HTLV-III-Virus im Blut (119), Speichel (56), Muttermilch (173) und Sperma (71,169) infizierter Träger ausgeschieden wird, ist die Ansteckungsgefahr im täglichen sozialen Umgang aufgrund der hohen Umweltempfindlichkeit des Virus äußerst gering (59). Zur Übertragung ist ein intensiver Schleimhautkontakt nötig, der bei den Homosexuellen durch Oral- und Analverkehr gegeben ist.

Zum weiteren Verständnis dieser Erkrankung sei auf Übersichtsarbeiten folgender Autoren verwiesen: A.J. PINCHING (119), E.B. HELM u. Mitarb. (65), K.O. HABERMehl (59) und M. VOGT u. Mitarb. (154).

Wie von anderen Autoren beschrieben (96), lagen auch in der vorliegenden Untersuchung die Serum-Immunglobulinkonzentrationen bei den 21 LAV/HTLV-III-positiven Männern signifikant höher als bei den 58 LAV/HTLV-III-negativen Homosexuellen (Tab.14).

Die Hyperimmunglobulinämie bei den Antikörper-positiven Homosexuellen geht wahrscheinlich auf eine unspezifische polyklonale Aktivierung von B-Lymphozyten zurück; sie ist Ausdruck der Störung des zellulären und humoralen Immunsystems bei LAV/HTLV-III-infizierten Personen (96).

4.2.1.4.3. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN SPERMATOZOENANTIKÖRPERN UND LAV/HTLV-III-ANTIKÖRPERN BEI HOMOSEXUELLEN MÄNNERN

1980 berichteten MATHUR U. MITARB. (103) von immunologischen Kreuzreaktionen zwischen Spermatozoen und T-Lymphozyten. Damit besteht die Möglichkeit, daß zirkulierende Spermatozoenantikörper an T-Lymphozyten binden und deren Funktion beeinträchtigen könnten.

Diese, nicht im Zusammenhang mit dem erworbenen Immundefektsyndrom AIDS gemachten Untersuchungen, waren für uns Anlaß, bei 89 Homosexuellen einen möglichen Zusammenhang zwischen Spermatozoenantikörpern und LAV/HTLV-III-Antikörpern nachzugehen.

Es zeigte sich, daß beide Antikörper nur selten gemeinsam auftraten. Von den 31 Spermatozoenantikörper-positiven Männern waren nur 16% LAV/HTLV-III-positiv, wogegen von den 58 Spermatozoenantikörper-negativen Homosexuellen 28% mit dem AIDS-assoziierten Virus infiziert waren (Abb.9).

Somit ist es wenig wahrscheinlich, daß Spermatozoenantikörper in irgendeiner Weise zu einem erhöhten Ansteckungsrisiko durch das Retrovirus führen.

Die Beobachtung, daß bei LAV/HTLV-III-positiven Männern sogar seltener Spermatozoenantikörper gefunden werden als bei LAV/HTLV-III-negativen Männern (24% gegen 38%), könnte auf zweierlei Art interpretiert werden.

Erstens: Durch Störung der B-Lymphozytenfunktion (96) und anderen Teilen des Immunsystems (54,91,137) wird eine Produktion von Spermatozoenantikörpern nicht mehr aufrechterhalten und ist somit bei einem Teil der LAV/HTLV-III-Infizierten nicht mehr nachweisbar.

Zweitens: Geht man davon aus, daß fast alle Homosexuellen ungeschützten Oral- und Analverkehr ausüben, fällt auf, daß nur ein Teil dieser Männer Antikörper gegen die stark immunogenen Spermatozoen bildet. Dies kann, wie in Kap.2.2.4. dargestellt, konstitutionell bedingt sein, wobei manche Menschen auf bestimmte

Stoffe mit einer Immunreaktion antworten und andere nicht (104,124). Andererseits sollten bei diesen Betrachtungen die im folgenden Kapitel näher beschriebenen immunsuppressiven Eigenschaften des rektal applizierten Seminalplasmas nicht vergessen werden. Möglicherweise beeinträchtigen immunsuppressiv wirkende Seminalplasmafaktoren (43,44,54,99,137,145) eine adäquate Immunantwort. Dies könnte sowohl zum leichteren Angehen einer LAV/HTLV-III-Infektion führen, als auch zum Versiegen der Spermatozoenantikörperproduktion. Wie eingangs gesagt, sind dies jedoch nur Denkansätze, für die es bisher keine Beweise gibt.

4.2.1.4.4. IMMUNSUPPRESSIVE EIGENSCHAFTEN DES SEMINALPLASMAS

In vitro lassen sich verschiedene immunsuppressive Eigenschaften des Seminalplasmas beobachten. LORD u. Mitarb. (99) zeigten, daß eine durch Gel-Filtrationschromatographie gewonnene hochmolekulare Seminalplasmafraktion (MW über 200.000 Daltons) Lymphozyten-Transformationsraten um bis zu 70% vermindert. Neben T- und B-Lymphozyten (43,44,99) scheinen noch weitere Komponenten des Immunsystems durch Seminalplasmaverdünnungen spezifisch hemmbar: Granulozyten und Monozyten (137), Teile des Komplementsystems (145) und die "Natural Killer"-Zellen (54). GLATER und ANDERSON (54) beschrieben Seminalplasmafaktoren, die die "Natural Killer"-Zellen erheblich in ihrer Fähigkeit schwächen, maligne transformierte Zellen zu erkennen und sie durch Zytolyse zu vernichten. Die Faktoren sind von niedrigem Molekulargewicht (um 300 Daltons), so daß die im Seminalplasma in hoher Konzentration vorkommenden Prostaglandine als Kandidaten in Frage kommen. Die bis zu Seminalplasmaverdünnungen von 1/500 beobachtete Hemmung der "Natural Killer"-Zellen könnte beim AIDS-Syndrom von Bedeutung sein, da "Natural Killer"-Zellen auch für die Eliminierung viral infizierter Zellen zuständig sind.

4.2.1.5. SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI LUES-PATIENTEN

Nur einer von 22 nicht-homosexuellen seropositiven Luespatienten (sowohl frische als auch ältere Fälle) wies Spermatozoenantikörper des Serums auf, was einer Prävalenz von 5% entspricht.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HARGREAVE u. Mitarb. (63) kann davon ausgegangen werden, daß Luesinfektionen im Allgemeinen keine Spermatozoenantikörperbildung induzieren.

4.2.1.6. SPERMATOZOENANTIKÖRPER BEI INFERTILEN FRAUEN

Aufgrund der relativ geringen Fallzahl von 40 Patientinnen lassen sich bezüglich der Spermatozoenantikörperprävalenz bei infertilen Frauen keine zuverlässigen Aussagen machen. Fünf von 40 Frauen (13%) hatten IgG- und IgM-Antikörper im Serum; sechs Frauen (15%) hatten Spermatozoenantikörper der Klasse IgA und IgG im Zervikalschleim. Nur eine von insgesamt 10 positiven Frauen hatte Spermatozoenantikörper sowohl im Serum als auch im Zervikalschleim. Ähnlich wie bei den infertilen Männern scheint auch bei Frauen nur eine geringe Korrelation zwischen Spermatozoenantikörpern im Serum und in den Genitalsekreten zu bestehen.

Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit Berichten von SCHUMACHER (138,139) und MOGHISSI (113), die ebenfalls nur in wenigen Fällen im Zervikalschleim relevante Mengen zirkulierender Spermatozoenantikörper fanden. Somit dürften bei den Frauen lokal im Genitaltrakt gebildete Antikörper vom Typ IgA und IgG für die Fertilität von wesentlich größerer Bedeutung sein als zirkulierende Spermatozoenantikörper(144).

Die klinische Bedeutung lokaler Antikörper liegt darin, daß sie Spermatozoen agglutinieren und immobilisieren können, was eine Penetration des Mucus und damit eine Befruchtung der Eizelle unmöglich macht (31,93).

4.2.2. ANAMNESE, KÖRPERLICHE UNTERSUCHUNG UND EJAKULATBEFUNDE DER ANDROLOGISCHEN PATIENTEN

Die Untersuchung der klinisch-anamnestischen Daten und der Spermioagrammbefunde der andrologischen Patienten in Relation zu den ELISA-Ergebnissen birgt die Problematik sehr kleiner Fallzahlen. Da extreme Werte in den kleinen Spermatozoenantikörperpositiven Untergruppen ($n = 7, 11, 13$) leicht falsche Verhältnisse vortäuschen können, werden neben den Mittelwerten ($\bar{x}$) auch die Medianwerte (M) und die empirische Standardabweichung (s) angegeben.

4.2.2.1. IN ALLEN UNTERGRUPPEN GLEICHMÄßIG VERTEILTE PARAMETER

Folgende Parameter sind bei Männern mit und ohne Spermatozoenantikörper gleich verteilt: Luesanamnese ; Varikozele ; Malescensus testis ; Ejakulatvolumen ; pH-Wert ; Spermatozoenmotilitäten ; Spermatozoenmorphologie ; Eosinwerte (% tote Spermatozoen) und Zyturtest (enzymatischer Leukozytennachweis). Von anderen Autoren wird nur wenig zu diesen Punkten berichtet. HARGREAVE u. Mitarb. (63) fanden in den Seren von 217 Männern, die eine Klinik für sexuell-übertragbare Krankheiten aufsuchten, kein gehäuftes Vorkommen von Spermatozoenantikörpern im Vergleich zu 151 beschwerdefreien Vasektomiekandidaten.

Gegen die Syphilis als möglichen ätiopathogenetischen Faktor bei der Bildung von Spermatozoenantikörpern spricht auch unser Ergebnis, daß unter 22 luesinfizierten Patienten nur einer Spermatozoenantikörper aufwies.

Das Vorliegen einer Varikozele führte wie in unserer Untersuchung auch in den Kollektiven von HUSTED (72) und SCHOENFELD u. Mitarb. (136) zu keiner erhöhten Spermatozoenantikörperprävalenz.

Malescensus testis, Orchidopexie und Kryptorchismus dürften ebenfalls nur eine geringe Rolle spielen. Der operative Eingriff einer Orchidopexie erfolgt meist im Kindesalter, also wenn das

Hodengewebe noch keine autoantigenen Eigenschaften besitzt. Kryptorchide Hoden sind auch im Erwachsenenalter meist nicht fähig, reife und damit autoantigene Spermatozoen zu bilden (135). Die häufig gemachte Beobachtung, daß bei einseitigem Kryptorchismus der normal deszendierte Hoden klinisch und histologisch Schädigungszeichen aufweist, ist wahrscheinlich nicht Folge einer Autoimmunreaktion, sondern Ausdruck einer primären Schädigung beider Hoden (135).

4.2.2.2. ANDROLOGISCHE PATIENTEN MIT SPERMATOZOENANTIKÖRPERN DER KLASSE IgG IM SERUM

In dieser Gruppe ($n = 7$) fallen im Vergleich zu den Patienten ohne Spermatozoenantikörper ($n = 149$) folgende Befunde auf: keine Kinder (0/7 gegen 14/149 oder 0% gegen 9%) ; relativ häufig verkleinerte Hoden (3/7 gegen 7/149 oder 43% gegen 5%) ; wesentlich geringere Spermatozoendichte ($\bar{x}$: 26 gegen 67 Mio/ml) und deutlich niedrigere Gesamtspermatozoenzahl ($\bar{x}$: 89 gegen 230 Mio/ml).

Der auffälligste Befund ist das relativ häufige Auftreten verkleinerter Hoden, die möglicherweise Folge von zellulären und humoralen Autoimmunreaktionen sind. In deren Verlauf könnte eine immunologisch induzierte Destruktion des Germinalepithels eingetreten sein (101); dies wäre eine Erklärung für die in vier von sieben Fällen (57%) vorliegenden Oligo- und Azoospermien in dieser Gruppe.

Bei zwei der drei Patienten mit hypoplastischen Hoden wurden Biopsien durchgeführt. In einem Fall wurde eine "Hypospermato-genese" diagnostiziert (Ejakulat: 6,9 Mio Sp./ml) und in dem anderen Fall imponierte neben einem Spermatogenesestop auf Stufe der Spermatozyten II (Ejakulat: 4,0 Mio Sp./ml) eine beträchtliche fibrotische Verdickung der Tubulus-Basalmembran, was möglicherweise ein Restzustand immunologisch-entzündlicher Vorgänge ist (101).

4.2.2.3. ANDROLOGISCHE PATIENTEN MIT SPERMATOZOENANTIKÖRPERN DER KLASSE IgM IM SERUM

Diese Gruppe ($n = 11$) zeigt im Vergleich zu den Antikörpernegativen Patienten nur wenig Auffälligkeiten: höheres Alter ($\bar{x}$: 37 gegen 33 Jahre) und länger bestehenden Kinderwunsch ($\bar{x}$: 6,5 gegen 3,8 Jahre).

Zwar wurde das häufigere Auftreten von Spermatozoenantikörpern bei älteren Männern u.a. auch von TUNG u. Mitarb. (151) beobachtet; über eine spezifische Häufung von Spermatozoenantikörpern der Klasse IgM bei älteren Männern liegen uns jedoch aufgrund der selten durchgeführten Differenzierung der Immunglobulinklassen keine Informationen vor. Möglicherweise sind die zirkulierenden IgM-Antikörper der Grund für die ansonsten nicht erklärbare längere Infertilitätsdauer in dieser Gruppe.

Auf welche Weise die IgM-Antikörper, die ja im Seminalplasma nicht nachweisbar sind (32,68,133), fertilitätsmindernd wirken, kann hierbei nicht gesagt werden.

An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß Spermatozoenantikörper in einigen Fällen möglicherweise nicht die Ursache einer Fertilitätsminderung darstellen, sondern lediglich im Rahmen einer immunologischen Begleitreaktion eine Art Indikator sind für Störungen ganz anderer Genese wie z.B. Entzündungen (12,161). Erwähnenswert ist, daß die im ELISA IgM-reaktiven Seren in 75% der Fälle auch Spermatozoenagglutinationen im Gelatine-Agglutinationstest auslösten und damit die beste Korrelation zu diesem Test aufweisen.

4.2.2.4. ANDROLOGISCHE PATIENTEN MIT SPERMATOZOENANTIKÖRPERN DER KLASSE IgA UND IgG IM SEMINALPLASMA

Die 13 Männer, die Spermatozoenantikörper im Seminalplasma aufwiesen, zeigen gegenüber Männern ohne Spermatozoenantikörper folgende Besonderheiten: keine Kinder (0/13 gegen 14/149 oder 0% gegen 9%) ; längeren Kinderwunsch (Median: 4,0 gegen 2,0 Jahre) ; häufiger Operationen im Genitalbereich (5/13 gegen 24/149 oder 38% gegen 16%) ; geringfügig häufiger Spermatozoenagglomerationen (2/13 gegen 13/149 oder 15% gegen 9%).

Die auffällig häufig erfolgten Operationen im Genitalbereich (3 x Varikozele, 1 x Fistel am Penis, 1 x Condylomata acuminata am Penis) könnten möglicherweise auf traumatischem Wege einen unphysiologischen Kontakt zwischen Spermatozoen und Immunsystem ermöglicht haben. Das etwas häufiger beobachtete Vorkommen von Spermatozoenagglomerationen paßt zwar qualitativ zu den Ergebnissen einiger Autoren, die in Verbindung mit Spermatozoenagglomerationen häufiger Spermatozoenantikörper fanden (49,124). Andersherum gesehen, waren jedoch nur bei zwei von insgesamt 15 Männern mit Spermatozoenagglomerationen auch Spermatozoenantikörper im Seminalplasma nachweisbar. Es ist also anzunehmen, daß im Gegensatz zu den Spermatozoenagglutinationen den unspezifischen Agglomerationen in den meisten Fällen nichtimmunologische Ursachen zugrunde liegen wie z.B. Bakterien oder Epithelzellen, an die sich Spermatozoen adhäsiv anlagern können (29,37).

Es fällt auf, daß keiner der Männer mit Spermatozoenantikörpern im Seminalplasma an einer akuten Samenwegsinfektion litt. Damit ist es unwahrscheinlich, daß Spermatozoenantikörper kreuzreagierende Bakterienantikörper sind.

Insgesamt weisen die Männer mit Spermatozoenantikörpern im Seminalplasma keine schlechteren Spermiogrammbefunde auf als Männer ohne Antikörper. Es könnten also die Spermatozoenantikörper allein die Ursache für die Kinderlosigkeit in dieser Gruppe sein.

4.2.3. IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN

4.2.3.1. IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN IN SPERMATOZOENANTIKÖRPER-POSITIVEN UND -NEGATIVEN SEREN

Die Untersuchung der Immunglobulinkonzentrationen der Seren ergab keinen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Spermatozoenantikörpern und abnorm erhöhten IgG- und IgM-Werten (Tab.13, Abb. 5 und 6). Dieses Ergebnis, das mit anderen Arbeiten gut übereinstimmt (32,48), erscheint aufgrund des großen Antikörperspektrums der IgG- und IgM-Globuline sehr plausibel.

Eine Ausnahme bildet die IgM-Konzentration bei LAV/HTLV-III-negativen homosexuellen Männern, die beim Vorliegen von zirkulierenden Spermatozoenantikörpern der Klasse IgM signifikant erhöht war ($\bar{x}$: 232 gegen 173 mg/dl; $p < 0,05$).

Es könnte spekuliert werden, daß im Gegensatz zu den höher konzentrierten IgG-Antikörpern (Normalbereich 800-1800 mg/dl) die IgM-Spermatozoenantikörper aufgrund der geringeren IgM-Gesamtmenge (60-250 mg/dl) eher ins Gewicht fallen, so daß sie sich in manchen Fällen in der IgM-Gesamtmenge widerspiegeln.

RICHARDS und WITKIN (121) berichten, daß gereinigte IgG-Immunglobuline unspezifisch über kovalente Disulfidbindungen an Spermatozoen binden können (121). Dies wirft die Frage nach falsch positiven Resultaten im ELISA auf. Wie jedoch gezeigt werden konnte, besteht zumindest bis zu einer IgG-Konzentration von 2500 mg/dl Serum kein Zusammenhang zwischen erhöhten IgG-Werten und einem gehäuftten Auftreten von Spermatozoenantikörpern der Klasse IgG (Abb.6). Damit können falsch-positive Spermatozoenantikörperergebnisse im ELISA durch abnorm erhöhte IgG-Werte in den vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden.

4.2.3.2. IMMUNGLOBULINKONZENTRATIONEN DER SEMINALPLASMEN

Im Gegensatz zu den Seren lagen in den Seminalplasmen zum Teil deutliche Unterschiede zwischen Spermatozoenantikörper-positiven und -negativen Proben vor.

So wiesen Seminalplasmen mit Spermatozoenantikörpern signifikant erhöhte lokale Immunglobulinkonzentrationen auf ($\bar{x}$: IgG 9,8 gegen 6,3 mg/dl, IgA 3,2 gegen 1,7 mg/dl; $p < 0,05$).

Dieses Phänomen wurde auch von anderen Autoren beobachtet (32,33). Es ist wohl dadurch erklärbar, daß Infektionen der Samenwege sowohl erhöhte lokale Immunglobulinkonzentrationen nach sich ziehen (33), als auch die Bildung von Spermatozoenantikörpern fördern können (12,161). Möglich erscheint auch, daß in manchen Fällen die Spermatozoenantikörper selbst für die Erhöhung der lokalen Immunglobulinkonzentration verantwortlich waren.

Mit 0 - 17 mg/dl IgG und 0 - 6 mg/dl IgA entsprechen die im Seminalplasma gefundenen Immunglobulinkonzentrationen gut den von anderen Autoren berichteten Werten (33,80,133).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im Gegensatz zum Serum im Seminalplasma gewisse Zusammenhänge zwischen Spermatozoenantikörpern und den Gesamtimmunglobulinkonzentrationen bestehen.

In nur einem von 13 Antikörper-positiven Fällen waren Spermatozoenantikörper des Seminalplasmas auch im Serum nachweisbar. Dies sind starke Hinweise für die Möglichkeit einer lokalen Antikörperbildung im Genitaltrakt (s.a. 47,79,147).

Aufgrund der geringen Korrelation zwischen Serum und Seminalplasma ist die Untersuchung des Seminalplasmas daher unverzichtbarer Bestandteil einer immunologischen Infertilitätsdiagnostik beim Mann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zunächst werden in einer Literaturübersicht Antigene menschlicher Spermatozoen beschrieben, die bei Frauen Isoantikörper und bei Männern Autoantikörper hervorrufen können. Wenn Spermatozoenantikörper in ausreichend hohen Titern in Seren und Genitalsekreten vorhanden sind, verursachen sie durch folgende Effekte eine klinisch relevante Minderung der Fertilität: Spermatozoenagglutination und -immobilisation, Festkleben der Spermatozoen an den Glykoproteinmizellen des Zervikalschleims und Minderung der Befruchtungsfähigkeit von Spermatozoen.

Normalerweise verhindern epitheliale Strukturen wie z.B. die Blut-Hoden-Schranke einen Kontakt zwischen den autoantigenen Spermatozoen und dem Immunsystem. Diese Barriere kann jedoch durch Ereignisse wie Vasektomie, Entzündung oder Trauma durchlässig werden, was eine Autosensibilisierung mit der Bildung von Spermatozoenantikörpern zur Folge hat.

Es werden die gängigen Methoden zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern beschrieben und hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile kritisch bewertet. Es wird aufgezeigt, daß die Berichte über die Prävalenz von Spermatozoenantikörpern bei Männern je nach Patientengut und Testmethode stark differieren. Als Näherungswert kann bei Vasektomierten eine Serumprävalenz von 50-60%, bei infertilen Männern von etwa 10% und bei sicher fertilen Männern von unter 4% Spermatozoenantikörpern angenommen werden.

Schließlich werden Therapiemöglichkeiten der immunologischen Infertilität des Mannes besprochen, wobei der intermittierend-hochdosierten Glukokortikoidtherapie zur Zeit die besten Erfolgsaussichten gegeben werden.

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, zunächst mit den zur Verfügung stehenden Reagenzien einen Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von Spermatozoenantikörpern zu entwickeln.

Dank der erstmals verwendeten positiv geladenen Mikrotiterplatten konnten die Spermatozoen unter Vermeidung der hochreaktiven Fixierungssubstanz Glutaraldehyd fest als Antigene an die Mikrotiterplatten gebunden werden. Auf diese Weise waren Antigenalterationen durch die Fixierungssubstanz ausgeschlossen.

Der Vergleich der ELISA-Methode mit dem herkömmlichen Gelatine-Agglutinationstest ergab nur eine mäßige Korrelation zwischen beiden Testmethoden, was jedoch aufgrund der verschiedenen Spezifitäten und Fehlermöglichkeiten beider Tests durchaus plausibel ist.

Bei 178 andrologischen Patienten mit Fertilitätsstörungen wurden mit der ELISA-Methode in 10% der Seren Spermatozoenantikörper ermittelt. Dieses Ergebnis befindet sich in guter Übereinstimmung mit den Resultaten anderer Autoren, die ähnliche Techniken anwendeten. Von 223 dermatologischen Kontrollpatienten ohne bekannte Fertilitätsstörungen wiesen 4% zirkulierende Spermatozoenantikörper auf. Das mit 35% häufigste Vorkommen von Spermatozoenantikörpern ergab sich bei 89 homosexuellen Männern; dies läßt sich wahrscheinlich auf die zahlreichen Antigenkontakte von Spermatozoen mit dem Immunsystem durch passiven Oral- und Analverkehr zurückführen.

In den Seminalplasmen der andrologischen Patienten fanden sich in 7% der Fälle Spermatozoenantikörper. Nur einer (3%) von insgesamt 29 Spermatozoenantikörper-positiven Patienten wies sowohl im Serum als auch im Seminalplasma Spermatozoenantikörper auf. Dieser Befund spricht für eine lokale Antikörperbildung im Genitaltrakt und gegen einen regelhaften Antikörpertransfer vom Serum ins Seminalplasma.

Es konnte gezeigt werden, daß Spermatozoenantikörper in den Seren zu keiner Erhöhung der Immunglobulinkonzentrationen führen, was aufgrund der Vielzahl zirkulierender Antikörper zu erwarten war. Im Gegensatz dazu hatten Männer mit Spermatozoenantikörpern im Seminalplasma signifikant erhöhte lokale Immunglobulinkonzentrationen, was möglicherweise Folge der Spermatozoenantikörperbildung ist.

Die anamnestische Befragung der andrologischen Patienten ergab für Männer mit Spermatozoenantikörpern: ein vergleichsweise höheres Alter, länger bestehenden Kinderwunsch, weniger gezeugte Kinder, häufiger verkleinerte Hoden und häufiger Operationen im Genitalbereich. Die Operationen könnten traumatische Ursache der Spermatozoenantikörperbildung sein, und die verkleinerten Hoden sind möglicherweise Folge einer humoralen oder zellulären Autoimmunreaktion.

Die Ejakulatbefunde der andrologischen Patienten ergaben keine gravierenden Unterschiede zwischen Spermatozoenantikörperpositiven und -negativen Männern. Dies spricht für die Beobachtung, daß Spermatozoenantikörper gehäuft in Fällen "unerklärbarer Sterilität" gefunden werden.

Untersuchungen an Zervikalschleimen infertiler Frauen zeigten, daß die Verflüssigung des hochviskösen Mukus nicht durch Bromelin erfolgen sollte. Das proteolytische Enzym führte zum Verschwinden vorher im ELISA nachweisbarer Spermatozoenantikörperaktivitäten. Dagegen beeinflusste Ultraschallbehandlung die Spermatozoenantikörper nicht, und ist somit die geeignetere Verflüssigungsmethode für Zervikalschleime.

Aufgrund von Literaturberichten über immunologische Kreuzreaktionen zwischen Spermatozoen und T-Lymphozyten wird ein möglicher Zusammenhang zwischen Spermatozoenantikörpern und LAV/HTLV-III-Antikörpern in den Seren von 89 homosexuellen Männern untersucht. Zirkulierende Spermatozoenantikörper fanden sich in 35% der Seren, und Antikörper gegen das AIDS-assoziierte LAV/HTLV-III-Virus waren in 24% der Seren vorhanden.

Es ergab sich kein gehäuftes gemeinsames Auftreten beider Antikörper. Männer mit Spermatozoenantikörpern wiesen sogar seltener LAV/HTLV-III-Antikörper auf als Männer ohne Spermatozoenantikörper (16% gegen 28%).

Somit ergibt sich kein Anhalt dafür, daß Spermatozoenantikörper als Kofaktoren einer LAV/HTLV-III-Infektion bei homosexuellen Männern eine relevante Rolle spielen. Vielmehr sollte jetzt den immunsuppressiven Eigenschaften des bei Homosexuellen häufig rektal applizierten Seminalplasmas mehr Aufmerksamkeit zukommen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABLIN R.J., SOANES W.A. (1972)
Experimental production of autoimmune aspermatogenic orchitis in the rabbit in consequence of in situ freezing of the testis.
Eur. Surg. Res. 4: 98-106.
2. ACKERMAN S.B., WORTHAM J.W.E., SWANSON R.J. (1981)
An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantitation of antisperm antibodies.
Am. J. Reprod. Immunol. 1: 199-205.
3. ALEXANDER N.J. (1984)
Antibodies to human spermatozoa impede sperm-penetration of cervical mucus or hamster eggs.
Fertil. Steril. 41: 433-439.
4. ALEXANDER N.J., ANDERSON D.J. (1979)
Vasectomy: consequences of autoimmunity to sperm antigens.
Fertil. Steril. 32: 253-260.
5. ALEXANDER N.J., BEARWOOD D. (1984)
An immunosorption assay for antibodies to spermatozoa: comparison with agglutination and immobilization tests.
Fertil. Steril. 41: 270-276.
6. ALEXANDER N.J., FULGHAM D.L. (1978)
Antibodies to spermatozoa in male monkeys: mode of action.
Fertil. Steril. 30: 334-342.
7. ALEXANDER N.J., KAY R. (1977)
Antigenicity of frozen and fresh spermatozoa.
Fertil. Steril. 28: 1234-1237.
8. ALEXANDER N.J., SAMPSON J.H., FULGHAM D.L. (1983)
Pregnancy rates in patients treated for antisperm antibodies with prednisone.
Int. J. Fertil. 28: 63-67.

9. ANDERSON D.J., ALEXANDER N.J. (1983)
A new look at antifertility vaccines.
Fertil. Steril. 40: 557-571.
10. ANSBACHER R. (1971)
Sperm-agglutinating and sperm-immobilizing antibodies in vasectomized men.
Fertil. Steril. 22: 629-632.
11. ANSBACHER R. (1981)
Humoral sperm antibodies: a 10-year follow-up of vas-ligated men.
Fertil. Steril. 36: 222-224.
12. BANDHAUER K. (1966)
Immunreaktionen bei Fertilitätsstörungen des Mannes.
Urol. int. 21: 247-282.
13. BANDHAUER K., MARBERGER E., MARBERGER H. (1964)
Immunologische Einflüsse auf männliche Fertilitätsstörungen. Experimentelle und klinische Untersuchungen.
Urologe 4: 222-227.
14. BARRE-SINOSSI F., CHERMANN J.C., REY F., NUGEYRE M.T., CHAMARET S., GRUEST J., DAUGUET C., AXLER-BLIN C., VEZINET-BRUN F., ROUZIOUX C., ROSENBAUM W., MONTAGNIER L. (1984)
Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).
Science 220: 868-871.
15. BARTSCH G., FRANK S., MARBERGER H., MIKUZ G. (1980)
Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function.
J. Urol. 124: 375-378.
16. BASKIN M.J. (1932)
Temporary sterilization by the injection of human spermatozoa.
Am. J. Obstet. Gynecol. 24: 892-897.

17. BEHRMAN S.J. (1975)
The immune response and infertility.
In: "Progress in Infertility". Hrsg.: S.J. Behrman und
R.W. Kistner. Little, Brown and Co., Boston, 1975, S.793-
815.
18. BITTER-SUERMAN D. (1983)
Das Komplementsystem: Physiologische Funktion und
klinische Bedeutung.
Dtsch. Ärztebl. 80. Jg., 51/52: 33-48.
19. BOETTCHER B., KAY D.J., RÜMKE P., WRIGHT L.E. (1971)
Human sera containing immunoglobulin and non-immuno-
globulin sperm agglutinins.
Biol. Reprod. 5: 236-245.
20. BOETTCHER B., HAY J., KAY D.J., BALDO B.A., ROBERTS T.K. (1970)
Spermagglutinating activity in some human sera.
Int. J. Fertil. 15: 143-158.
21. BOETTCHER B., HJORT T., RÜMKE P., SHULMAN S., VYAZOW O.E. (1977)
Auto- and isoantibodies to antigens of the human
reproductive system. Results of an international
comparative study of antibodies to spermatozoa and other
antigens detected in sera from infertile patients
deposited in the WHO Reference Bank for Reproductive
Immunology.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. C, Suppl. Nr. 258.
22. BORN M., VON DER HELM K., WERNICKE D., DEINHARDT F. (1985)
Presence of antibodies to human lymphoma-leucemia virus
(HTLV-I) in germans with symptoms of the acquired
immunodeficiency syndrome (AIDS).
J. Med. Virol. 15: 57-63.
23. BRAUN-FALCO O., PLEWIG G., WOLFF H.H. (1984)
Sarcoma idiopathicum multiplex haemorrhagicum (Kaposi
1872).
In: "Dermatologie und Venerologie", Hrsg.: O. Braun-
Falco, G. Plewig und H.H. Wolff, Springer Verlag, Berlin
Heidelberg New York Tokio, S. 914-916.

24. BRONSON R.A., COOPER G.W., ROSENFELD D. (1981)
 Membrane-bound sperm-specific antibodies: their role in infertility.
 In: "Bioregulators in Reproduction". Hrsg.: H. Vogel und G. Jagiello. Academic Press, New York, 1981, S. 521ff.
25. BRONSON R.A., COOPER G.W., ROSENFELD D. (1982)
 Sperm-specific isoantibodies and autoantibodies inhibit the binding of human sperm to the human zona pellucida.
 Fertil. Steril. 38: 724-729.
26. BRONSON R.A., COOPER G.W., ROSENFELD D. (1984)
 Sperm antibodies: their role in infertility.
 Fertil. Steril. 42: 171-183.
27. BURNET F.M., FENNER F. (1958)
 "The clonal selection theory of acquired immunity".
 Cambridge University Press. London. 1958.
28. BUTLER W.T., ROSSEN R.D. (1973)
 Effects of corticosteroids on immunity in men. I. Decreased serum IgG concentrations caused by 3 to 5 days high doses of methylprednisone.
 J. Clin. Invest. 52: 2629-2640.
29. COOMAN S.E., ABDALLAH M.A., SCHIRREN C. (1972)
 Sperm autoagglutination.
 Andrologie 4: 61-68.
30. DAUGAARD G., PETERSEN H.D., ABILDGAARD V., MARCUSSEN H., WALLACH M., JESS P., HJORT T., JOHNSON S.G. (1983)
 Sequelae to genital trauma in torture victims.
 Arch. Androl. 10: 245-248.
31. DE ALMEIDA M., JOUANNET P. (1982)
 Sperm antibodies in cervical mucus.
 In: "Immunological Factors in Human Reproduction". Hrsg.: S. Shulman, F. Dondero und M. Nicotra. Academic Press, London und New York, 1982, S. 19-27.
32. DONAT H., SCHILLER S. (1983)
 Immunglobulingehalt humanen Seminalplasmas.
 Andrologia 15: 369-373.

33. DONDERO F., RADICIONI A., GANDINI L., LENZI A. (1984)
Immunoglobulins in human seminal plasma.
Andrologia 16: 228-236.
34. ENGVALL E., PERLMAN P. (1971)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochem. 8: 871-874.
35. FAUCI A.S., DALE D.C., BALOW J.E. (1976)
Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations.
Ann. Int. Med. 84: 304-315.
36. FELLOUS M., DAUSSET J. (1970)
Probable haploid expression of HL-A antigens on human spermatozoon.
Nature 225: 191-193.
37. FJÄLLBRANDT B. (1965)
Immunoagglutination of sperm in cases of sterility.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 44: 474-490.
38. FJÄLLBRANDT B. (1968)
Sperm antibodies and sterility in men.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 47, *Suppl.* 4: 1-38.
39. FJÄLLBRANDT B., NILSSON S. (1977)
Decrease of sperm antibody titer in males, and conception after treatment of chronic prostatitis.
Int. J. Fert. 22: 255-256.
40. FJÄLLBRANDT B., OBRANT O. (1968)
Clinical and seminal findings in men with sperm antibodies.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 47: 451-468.
41. FRANCAVILLA F., CATIGNANI P., ROMANO R., SANTUCCI R., FRANCAVILLA S., SANTIEMMA V. (1983)
Modification of the slide agglutination test for the detection of sperm-agglutinins.
Andrologia 15: 699-704.

42. FRANKEN D.R., SLABBER C.F. (1980)
Spermagglutinating antibodies: a comparison of three different techniques.
Andrologia 12: 20-24.
43. FRANKEN D.R., SLABBER C.F. (1982)
Reproductive Immunology. III. The effect of seminal plasma from oligozoospermic men on in vitro lymphocyte cultures.
Andrologia 14: 8-11.
44. FRANKEN D.R., DU TOIT P.J., GROBLER S., PRETORIUS E. (1984)
Lymphocyte transformation rates of homosexual men in presence of seminal plasma.
Arch. Androl. 12: 1-3.
45. FRIBERG J. (1974)
Clinical and immunological studies on sperm-agglutinating antibodies in serum and seminal fluid.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 53, Suppl. 36: 1-19.
46. FRIBERG J. (1974)
A simple and sensitive micro-method for demonstration of sperm agglutinating activity in sera from infertile men and women.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 53, Suppl. 36: 21-29.
47. FRIBERG J. (1974)
Immunological studies on human sperm-agglutinating seminal fluid.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 53, Suppl. 36: 31-42.
48. FRIBERG J. (1980)
Immunoglobulin concentration in serum and seminal fluid from men with and without sperm-agglutinating antibodies.
Am. J. Obstet. Gynecol. 136: 671-675.
49. FRIBERG J., KJESSLER B. (1975)
Sperm agglutinating antibodies and testicular morphology in fifty-nine men with azoospermia or cryptozoospermia.
Am. J. Obstet. Gynecol. 121: 987-990.

50. FRIBERG J., TILLY-FRIBERG I. (1977)
 Spontaneous spermagglutination in ejaculates from men
 with head-to-head or tail-to-tail spermagglutinating
 antibodies in serum.
 Fertil. Steril. 28: 658-662.

51. FUCHS E.F., ALEXANDER N.J. (1983)
 Immunologic considerations before and after
 vasovasostomy.
 Fertil. Steril. 40: 497-499.

52. GALLO R.C., SALAHUDDIN S.Z., POPOVIC M., SHEARER G.M., KAPLAN
 M., HAYNES B.F., PALKER T.J., REDFIELD R., OLESKE J., SAFAI
 B., WHITE G., FOSTER P., MARKHAM P.D. (1984)
 Frequent detection and isolation of cytopathic retro-
 viruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk
 for AIDS.
 Science 224: 500-503.

53. GIRGIS S.M., EKLADIOUS E.M., ISKANDER R., EL-DAKHLY R.,
 GIRGIS F.N. (1982)
 Sperm antibodies in serum and semen in men with bilateral
 congenital absence of the vas deferens.
 Arch. Androl. 8: 301-305.

54. GLATER G.B., ANDERSON D.J. (1985)
 Human seminal plasma inhibits the cytotoxic effect of
 natural killer (NK) cells.
 J. Androl. (Suppl.) 6: 57 (abstract M38).

55. GOTTLIEB M.S., SCHROFF R., SCHANKER H.M., WEISMAN J.D., FAN
 P.T., WOLF R.A., SAXON A. (1981)
 Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in
 previously healthy homosexual men.
 N. Engl. J. Med. 305: 1425-1431.

56. GROOPMAN J.I., SALAHUDDIN S.Z., SARNAGADHARAN M.G., MARKHAM
 P.D., GONDA M., SLISKI A., GALLO R.C. (1984)
 HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex
 and healthy homosexual men at risk for Aids.
 Science 226: 447-449.

57. GÜNTHER E. (1969)
Immunologische Aspekte der männlichen Infertilität.
Hautarzt 10: 433-438.
58. GUPTA K.G., GARG A.K. (1975)
Presence of antisperm antibodies in fertile and infertile persons.
Acta Obstet. Gynec. Scand. 54: 407-410.
59. HABERMEHL K.O. (1985)
AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
Internist 26: 113-120.
60. HAENSCH R. (1973)
Spermatozoen - Autoimmunphänomene bei Genitaltraumen und Verschlussazoospermie.
Andrologie 5: 147-152.
61. HANAFIAH M.J., EPSTEIN J.A., SOBRERO A.J. (1972)
Spermagglutinating antibodies in 236 infertile couples.
Fertil. Steril. 23: 493-497.
62. HANSEN K.B., HJORT T. (1971)
Immunofluorescent studies on human spermatozoa.
Clin. exp. Immunol. 9: 21-31.
63. HARGREAVE T.B., HARVEY J., ELTON R.A., MC MILLAN A. (1984)
Serum agglutinating and immobilizing sperm antibodies in men attending a sexually transmitted diseases clinic.
Andrologia 16: 111-115.
64. HEKMAN A., RÜMKE P. (1969)
The antigens of human seminal plasma.
Fertil. Steril. 20: 312-323.
65. HELM E.B., BERGMANN L., EBERT M., MITROU P., STILLE W. (1984)
Verlaufsbeobachtungen bei Patienten mit Lymphadenopathie-Syndrom.
Dtsch. med. Wschr. 109: 1955-1962.
66. HENDRY W.F., STEDRONSKA J., PARSLow J., HUGHES L. (1981)
The results of intermittend high dose steroid therapy for male infertility due to antisperm antibodies.
Fertil. Steril. 36: 351-355.

67. HENDRY W.F., STEDRONSKA J., PARSLow J., HUGHES L. (1982)
Male infertility due to antisperm antibodies: results of
intermittent high dose steroid treatment.
In: "Immunological Factors in Human Reproduction", Serono
Symposium, Hrsg.: S. Shulman, F. Dondero und M. Nicotra,
New York, Academic Press, 1982, Vol. 45.
68. HERRMANN W.P. (1981)
Sekrete des männlichen Genitaltraktes und
Spermatozoentransport.
In: "Menschliche Fortpflanzung". Hrsg.: R. Kaiser und
G.F.B. Schumacher, Thieme Verlag, Stuttgart-New York,
1981, S. 92-99.
69. HJORT T., HUSTED S. (1975)
Autoimmunity to sperm.
Proc. Royal Soc. Med. 68: 253-255.
70. HJORT T., HUSTED S., LINNET-JENSEN (1974)
The effect of testis biopsy on autosensitization against
spermatozoal antigens.
Clin. exp. Immunol. 18: 201-212.
71. HO D.D., SCHOOLEY R.T., ROTA T.R., KAPLAN J.C., FLYNN T.,
SALAHUDDIN S.Z., GONDA M.A., HIRSCH M.S. (1984)
HTLV-III in the semen and blood of a healthy homosexual
man.
Science 226: 451-453.
72. HUSTED S. (1975)
Sperm antibodies from men in infertile couples.
Int. J. Fertil. 20: 113-121.
73. HUSTED S., INGERSLEV H.J. (1975)
Comparison of methods for the detection of immobilizing
and cytotoxic sperm antibodies.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 83: 347-353.
74. INGERSLEV H.J. (1980)
Spermagglutinating antibodies and sperm penetration of
cervical mucus from infertile women with sperm-
agglutinating antibodies in serum.
Fertil. Steril. 34: 561-568.

75. INGERSLEV H.J., POULSEN F. (1980)
 Bromelin for liquefaction of cervical mucus in sperm antibody testing: its effect on sperm-agglutinating immunoglobulin G.
 Fertil. Steril. 35: 61-63.
76. ISAHAKIA M., ALEXANDER N.J. (1984)
 Interspecies cross-reactivity of monoclonal antibodies directed against human sperm antigens.
 Biol. Reprod. 30: 1015-1026.
77. ISAHAKIA M., ALEXANDER N.J. (1984)
 Vasectomy-induced autoimmunity: antisperm and antinuclear autoimmune monoclonal antibodies.
 Am. J. Reprod. Immunol. 5: 117-127.
78. ISOJIMA S., LI T.S., ASHITAKA Y. (1968)
 Immunologic analysis of sperm-immobilizing factor found in sera of women with unexplained sterility.
 Am. J. Obstet. Gynecol. 101: 677-683.
79. JAGER S., KREMER J., VAN SLOCHTEREN-DRAAISMA T. (1978)
 A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male: detection of spermatozoan surface IgG with the direct mixed agglutination reaction carried out on untreated fresh human semen.
 Int. J. Fertil. 23: 12-21.
80. JAGER S., KREMER J., KUIKEN J., VAN SLOCHTEREN T. (1980)
 Immunoglobulin class of antispermatozoal antibodies from infertile men and inhibition of in vitro sperm penetration into cervical mucus.
 Int. J. Androl. 3: 1-14.
81. JOHNSON M.H. (1970)
 An immunological barrier in the guinea pig testis.
 J. Pathol. 101: 129.
82. JOHNSON W.J., MENGE A.C. (1975)
 Evaluation of human sera for antibodies against sperm by immunofluorescence.
 Fertil. Steril. 26: 721-729.

83. JONES W.R. (1980)
Immunologic infertility - fact or fiction?
Fertil. Steril. 33: 577-586.
84. KALISH S.B., OSTROW D.G., GOLDSMITH J., HSU C.C.S., CHMIEL J.S., WALLENMARK C.B., PHAIR J.P. (1984)
The spectrum of immunologic abnormalities and clinical findings in homosexually active men.
J. Infect. Dis. 149: 148-156.
85. KAY D., BOETTCHER B. (1983)
Treatment of men with auto-immunity to spermatozoa.
J. Reprod. Immunol. (Suppl.) 5: 47.
86. KEREK G., AFZELIUS B.A. (1972)
The HL-A antigens on human spermatozoa.
Int. J. Fertil. 17: 120-126.
87. KIBRICK S., BELDING D.L., MERRIL B. (1952)
Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa. II. A gelatin agglutination test.
Fertil. Steril. 3: 430-438.
88. KILLE J.W., GOLDBERG E. (1979)
Female reproductive tract immunoglobulin responses to a purified sperm specific antigen (LDH-C₄).
Biol. Reprod. 20: 863-871.
89. KÖHLER G., MILSTEIN C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.
Nature 256: 495-497.
90. KOLK A.H.J., SAMUEL T., RUMKE P. (1974)
Auto-antigens of human spermatozoa. I. Solubilization of a new auto-antigen detected on swollen sperm heads.
Clin. exp. Immunol. 16: 63-76.
91. KORNFELD H., VAN DE STOUWE R.A., LANGE M., REDDY M.M., GRIECO M.H. (1982)
T-lymphocyte subpopulations in homosexual men.
N. Engl. J. Med. 307: 729-731.

92. KRAUSE W., MEYHÖFER W. (1973)
Unterdrückung spermaagglutinierender Autoantikörper im Serum durch Azathioprin (Imurek®).
Hautarzt 24: 551-552.
93. KREMER J., JAGER S. (1976)
The sperm-cervical mucus contact test: a preliminary report.
Fertil. Steril. 27: 335-340.
94. LAEMMLI U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685.
95. LANDSTEINER K. (1899)
Zur Kenntnis der spezifisch auf Blutkörperchen wirkenden Sera.
Zentralbl. f. Bakteriologie 25: 546-549.
96. LANE H.C., MASUR H., EDGAR L.C., WHALEN G., ROOK A.H., FAUCI A.S. (1983)
Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome.
N. Engl. J. Med. 309: 453-458.
97. LEWIS-JONES D.I., DE MARVAL M.M., HARRISON R.G. (1982)
Impairment of rat spermatogenesis following unilateral experimental ischemia.
Fertil. Steril. 38: 482-490.
98. LINNET L., HJORT T. (1977)
Sperm agglutinins in seminal plasma and serum after vasectomy. Correlation between immunological and clinical findings.
Clin. exp. Immunol. 30: 413-420.
99. LORD E.M., SENSABAUGH G.F., STITES D.P. (1977)
Immunosuppressive activity of human seminal plasma. I. Inhibition of in vitro lymphocyte activation.
J. Immunol. 118: 1704-1711.

100. LUCAS P.L., ROSE N.R. (1978)
 Immunological consequences of vasectomy. I. Prospective study through one-year postvasectomy.
 Arch. Androl. 1: 249-255.

101. MANCINI R.E. (1971)
 Immunological factors and infertility.
 In: "Fertility Disturbances in Men and Women". Karger, Basel, 1971, S. 189-205.

102. MANCINI R.E., ANDRADA J.A., SARACENI A., BACHMANN A.E., LAVIERI J.C., NEMIROVSKY M. (1965)
 Immunological and testicular response in man sensitized with human testicular homogenate.
 J. clin. Endocrinol. 25: 859-875.

103. MATHUR S., GOUST J.M., WILLIAMSON H.D., FUDENBERG H.H. (1981)
 Cross-reactivity of sperm and T-lymphocyte antigens.
 Am. J. Reprod. Immunol. 1: 113-118.

104. MATHUR S., GENCO P.V., WILLIAMSON H.D., KOOPMAN W.R., RUST P.F., FUDENBERG H.H. (1983)
 Association of human leucocyte antigens B7 and BW35 with sperm antibodies.
 Fertil. Steril. 39: 343-349.

105. MATHUR-WAGH V., ENLOW R.W., SPIGLAND J., WINCHESTER R.J., SACKS H.S., RORAT E., YANCOVITZ S.R., KLEIN M.J., WILLIAM D.C., MILDVAN D. (1984)
 Longitudinal study of persistent generalized lymphadenopathy in homosexual men: relation to the acquired immunodeficiency syndrome.
 Lancet 1984/I: 1033-1038.

106. MAUCHER O.M., HEITE H.J., VOGEL G. (1975)
 Studien über Spermienantikörper in menschlichen Seren anhand der Immunfluoreszenztechnik.
 Arch. Dermatol. Forsch. 254: 121-133.

107. MAVLIGIT G.M., TALPAZ M., HSIA F.T., WONG W., LICHTIGER B.,
MANSELL P.W.A., MUMFORD D.M. (1984)
Chronic immune stimulation by sperm alloantigens. Support
for the hypothesis that spermatozoa induce immune
dysregulation in homosexual males.
JAMA 251: 237-241.
108. MENGE A.C., BLACK C.S. (1979)
Effects of antisera on human sperm penetration of zona
free hamster ova.
Fertil. Steril. 32: 214-218.
109. METALNIKOV S. (1900)
Etudes sur la spermatoxine.
Ann. Inst. Pasteur 14: 577.
110. METCHNIKOFF E. (1899)
Etudes sur la resorption des cellules.
Ann. Inst. Pasteur 13: 737-769.
111. METTLER L., CZUPPON A.B. (1985)
Spermaantikörper-Nachweis in Seren steriler Patienten
mittels RIA und ELISA im Vergleich zu den herkömmlichen
Agglutinations- und Immobilisationstests und Hamster-
Oozyten-Penetrationstest.
Lab. med. 9: 70-73.
112. MILDVAN D., MATHUR V. ENLOW W.R. et al. (1982)
Opportunistic infections and immune deficiency in
homosexual men.
Ann. Int. Med. 96: 700-704.
113. MOGHISSI K.S., SACCO A.G., BORIN K. (1981)
Immunologic infertility: pregnancies in patients with
sperm antibodies activity.
In: "Advances in Diagnosis and Treatment of Infertility".
Hrsg.: V. Insler und G. Bettendorf, Elsevier North
Holland New York, 1981, S. 235-242.
114. NAGLER H.M., DEITCH A.D., DE VERE WHITE R. (1984)
Testicular torsion: temporal considerations.
Fertil. Steril. 42: 257-262.

115. NAZ R.K., ALEXANDER N.J., ISAHAKIA M., HAMILTON M.S. (1984)
Monoclonal antibody to a human germ cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization.
Science 225: 342-344.
116. PAUL S., BAUKLOH V., METTLER L. (1983)
Enzyme-linked immunosorbent assays for sperm antibody detection and antigenic analysis.
J. Immunol. Methods 56: 193-199.
117. PHADKE A.M., PADUKONE K. (1964)
Presence and significance of autoantibodies against spermatozoa in the blood of men with obstructed vas deferens.
J. Reprod. Fertil. 7: 163-170.
118. PHILLIP M., KLEINMAN D., POTASHNIK G., INSLEER V. (1984)
Antigenicity of sperm cells after freezing and thawing.
Fertil. Steril. 41: 615-619.
119. PINCHING A.J. (1984)
The acquired immune deficiency syndrome.
Clin. exp. Immunol. 56: 1-13.
120. RAJGOPAL R., RAO S.S. (1979)
An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-sperm antibodies.
Indian J. Med. Res. 70: 440-443.
121. RICHARDS J.M., WITKIN S.S. (1984)
Non-immune IgG binding to the surface of spermatozoa by disulphide rearrangement.
Clin. exp. Immunol. 58: 493-501.
122. ROSE N.R., HJORT T., RÜMKE P., HARPER M.J.K., VYAZOV O. (1976)
Techniques for detection of iso- and autoantibodies to human spermatozoa.
Clin. exp. Immunol. 23: 175-199.
123. RÜMKE P. (1954)
The presence of sperm antibodies in the serum of two patients with oligozoospermia.
Vox. Sang. (Basel) 4: 135-140.

124. RUMKE P. (1968)
Sperm-agglutinating autoantibodies in relation to male infertility.
Proc. Royal Soc. Med. 61/1: 275-278.
125. RUMKE P. (1969)
Autoimmunität gegen Spermatozoen.
In: "Autoimmunerkrankungen". Hrsg.: W. Brendel und V. Hopf, Schattauer Verlag, Stuttgart, 1969, S. 283-292.
126. RUMKE P. (1971)
Autoantikörperbildung gegen Spermatozoen infolge Extravasation von Spermatozoen ins Interstitium der Epididymis älterer Männer.
Schweiz. Med. Wschr. 101: 1439-1441.
127. RUMKE P. (1974)
The origin of immunoglobulins in semen.
Clin. exp. Immunol. 17: 287-297.
128. RUMKE P., HELLINGA G. (1959)
Autoantibodies against spermatozoa in sterile men.
Am. J. Clin. Pathol. 32: 357-363.
129. SCHILL W.-B. (1977)
Immunologische Aspekte der Vasektomie.
Dtsch. Med. Wschr. 102: 1853-1859.
130. SCHILL W.-B. (1982)
Aktueller Stand der medikamentösen Therapie männlicher Fertilitätsstörungen.
Hautarzt 33: 468-480.
131. SCHILL W.-B., HOFSTETTER A., STOCK M. (1975)
Zur Frage der Autoantikörperbildung nach freiwilliger Vasektomie.
Urologe 14: 194-198.
132. SCHILL W.-B., PETZOLD D., KAMMERL M. (1976)
Untersuchungen über das Vorkommen autologer Spermatozoenantikörper in einem unausgewählten andrologischen Patientengut.
Hautarzt 27: 382-390.

133. SCHILL W.-B., KRASSNIGG F., MÜLLER-ESTERL W., FINK E. (1984)
Quantitative determination of different proteins in
normal and pathological semen.
In: "Protides of the Biological Fluids", Hrsg.: H.
Peeters, Pergamon Press, Oxford and New York, 1984,
S. 293-297.
134. SCHIRREN C. (1982)
Die Ejakulatuntersuchung.
In: "Praktische Andrologie", Hrsg.: C. Schirren, Karger
Verlag, Basel, 1982, S. 19-33.
135. SCHIRREN C. (1982)
Der Hodenhochstand.
In: "Praktische Andrologie", Hrsg.: C. Schirren, Karger
Verlag, Basel, S. 62-66.
136. SCHOENFELD C., AMELAR R.D., DUBIN L. (1976)
Clinical experience with sperm antibody testing.
Fertil. Steril. 27: 1199-1203.
137. SCHOPF R.E., SCHRAMM P., BENES P., MORSCHES B. (1984)
Seminal plasma induced suppression of respiratory burst
of polymorphnuclear leucocytes and monocytes.
Andrologia 16: 124-128.
138. SCHUMACHER G.F.B. (1981)
Sekrete des weiblichen Genitaltraktes.
In: "Menschliche Fortpflanzung", Hrsg.: R. Kaiser und
G.F.B. Schumacher, Thieme Verlag, Stuttgart-New York,
1981, S. 70-84.
139. SCHUMACHER G.F.B. (1981)
Immunologische Aspekte bei Empfängnisschwierigkeiten der
Frau.
In: "Menschliche Fortpflanzung", Hrsg.: R. Kaiser und
G.F.B. Schumacher, Thieme Verlag, Stuttgart-New York,
1981, S. 200-216.
140. SHULMAN G.F., SHULMAN S. (1982)
Methylprednisolone treatment of immunologic infertility
in the male.
Fertil. Steril. 38: 591-599.

141. SHULMAN S. (1976)
Treatment of immune male infertility with methyl-
prednisolone.
Lancet 2: 1243.
142. SHULMAN S., HARLIN B., DAVIS P., REYNIAC J.V. (1978)
Immune infertility and new approaches to treatment.
Fertil. Steril. 29: 309-319.
143. STOLP P., BACHNER U., BECK K.J., KESSLER M., SCHNEIDER J. (1973)
Occurrence of the HL-A antibodies in sera of sterile
women.
Int. J. Fertil. 18: 141-144.
144. SUDO N., SHULMAN S., STONE M.L. (1977)
Antibodies to spermatozoa. IX. Sperm-agglutinating
phenomenon in cervical mucus in vitro: a possible cause
in infertility.
Am. J. Obstet. Gynecol. 129: 360-367.
145. TARTER T.H., ALEXANDER N.J. (1984)
Complement-inhibiting activity in seminal plasma.
Am. J. Reprod. Immunol. 6: 28-32.
146. THOMAS A.J., PONTES J.E., ROSE N.R., SEGAL S., PIERCE J.M. (1981)
Microsurgical vasovasostomy: immunologic consequences and
subsequent fertility.
Fertil. Steril. 35: 447-450.
147. TOMASI T.B., BIENENSTOCK J. (1968)
Secretory immunoglobulins.
Adv. in Immunol. 9: 1-96.
148. TOPLEY W., WILSON G.S. (1974)
The zone phenomenon. Optimal antigen-antibody ratio.
In: "Principles of Bacteriology, Virology and Immunity",
Hrsg.: W. Topley und G.S. Wilson, E. Arnold Verlag,
London, 1974, S. 256-257.
149. TOPLEY W., WILSON G.S. (1974)
The mechanism of antibody formation.
In: "Principles of Bacteriology, Virology and Immunity",
Hrsg.: W. Topley und G.S. Wilson, E. Arnold Verlag,
London, 1974, S. 1385-1418.

150. TUNG K.S.K., UNANUE E.R., DIXON F.J. (1971)
Pathogenesis of experimental allergic orchitis.
J. Immunol. 106: 1453-1472.
151. TUNG K.S.K., COOKE W.D., MC CARDY T.A., ROHITAILLE P. (1976)
Human sperm antigens and antisperm antibodies. II. Age
related incidence of antisperm antibodies.
Clin. exp. Immunol. 25: 73-79.
152. VAN KOOLIJ R.J. (1984)
Solubilization of cervical mucus with bromelain and
mechanical means.
Int. J. Fertil. 29: 81-84.
153. VIDAL G.P., KATO T., SASAKI M. (1975)
Cleavage sites of human IgG by soluble and water-
insoluble stem bromelain.
Immunochem. 12: 403-409.
154. VOGT M., LÜTHY R., SIEGENTHALER W. (1985)
Das erworbene Immundefizienzsyndrom (AIDS). Eine Bilanz nach
4 Jahren.
Schweiz. med. Wschr. 115: 665-671.
155. VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A. (1979)
The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Hrsg.: Die Autoren, London, 1979.
156. WALL J.R., STEDRONSKA J., DAVID R., HARRISON R., GORIUP D.,
LESSOF M. (1975)
Immunologic studies of male infertility.
Fertil. Steril. 26: 1035-1041.
157. WEIL A.J., RODENBURG J.M. (1962)
The seminal vesicle as the source of the spermatozoa-
coating antigen of seminal plasma.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109: 567-570.

158. WERNICKE D., VON DER HELM K., ABB J., EBERLE J., ZOULEK G.,
PLEYL G., DEINHARDT F., RIETHMÜLLER G., ZIEGLER-HEITBROCK
H.W.L., RIEBER E.P., BRAUN-FALCO O., RING J., BRUNNER R.,
PIECHOWIAK H. (1984)
Antikörper gegen menschliches T-Zell-Leukämie Virus Typ
III bei erworbenem Immundefekt-Syndrom und persistieren-
der Lymphadenopathie.
Dtsch. Med. Wschr. 109: 1709-1711.
159. WILSON L. (1954)
Sperm agglutinins in human semen and blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85: 652-655.
160. WITKIN S.S., SONNABEND J. (1983)
Immune responses to spermatozoa in homosexual men.
Fertil. Steril. 39: 337-342.
161. WITKIN S.S., TOTH A. (1983)
Relationship between genital tract infections, sperm
antibodies in seminal fluid, and infertility.
Fertil. Steril. 40: 805-808.
162. WITKIN S.S., ZELIKOVSKY G., GOOD R.A., DAY N. (1981)
Demonstration of IIs IgA antibody to spermatozoa in human
seminal fluid.
Clin. exp. Immunol. 44: 368-374.
163. WITKIN S.S., SHAHANI S.K., GUPTA S., GOOD R.A., DAY N.K. (1980)
Demonstration of IgG Fc receptors on spermatozoa and
their utilization for the detection of circulating immune
complexes in human sera.
Clin. exp. Immunol. 41: 441-452.
164. WOLF D.P., ROWLANDS D.T., HAAS G.G. (1982)
Antibodies to sperm-associated antigens detected by solid
phase assays.
Biol. Reprod. 26: 140-146.
165. WOLFF H., SCHILL W.-B. (1985)
A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for
the detection of antisperm antibodies.
Andrologia 17: 426-434.

166. WOLFF H., SCHILL W.-B. (1985)
Antisperm antibodies in infertile and homosexual men:
relationship to serologic and clinical findings.
Fertil. Steril. 44: 673-677.
167. WOLFF H., SCHILL W.-B. (1986)
Detection and quantitation of sperm antibodies by a
modified ELISA technique.
In: "Immunoassay Technology", Band 2, Hrsg.: S.B. Pal,
Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York, S. 215-227.
168. WOLFF H., SCHILL W.-B. (1986)
Determination of sperm antibodies in human genital
secretions by an ELISA technique.
Arch. Gynecol., in Druck.
169. YANAGIMACHI R., YANAGIMACHI H., ROGERS B.J. (1976)
The use of zona-free animal ova as a test-system for the
assessment of the fertilizing capacity of human
spermatozoa.
Biol. Reprod. 15: 471-476.
170. ZAGURY D., BERNARD J., LEIBOVITCH J., SAFAI B., GROOPMAN
J.E., FELDMAN M., SARNEGADHARAN M.G., GALLO R.C. (1984)
HTLV-III in cells cultured from semen of two patients
with AIDS.
Science 226: 449-451.
171. ZANCHETTA R., BUSOLO F., MASTROGIACOMO I. (1982)
The enzyme-linked immunosorbent assay for the detection
of antispermatozoal antibodies.
Fertil. Steril. 38: 730-734.
172. ZANEVELD L.J.D., SCHUMACHER G.F.B., TRAVIS J. (1973)
Human sperm acrosomal proteinase: antibody inhibition and
immunologic dissimilarity to human pancreatic trypsin.
Fertil. Steril. 24: 479-484.
173. ZIEGLER J.B., COOPER D.A., JOHNSON R.O., GOLD J. (1985)
Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from
mother to infant.
Lancet 1985/I: 896-898.

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. W.-B. Schill danke ich für die Überlassung des Themas und seine immer freundliche Unterstützung bei der Durchführung der wissenschaftlichen Untersuchungen.

Frau M. Feifel danke ich für die bereitwillige Unterstützung meiner Arbeiten im andrologischen Forschungslabor und für die Vermittlung ihres großen Erfahrungsschatzes.

Herrn Dr. phil. nat. F. Krassnigg danke ich für die fundiert-naturwissenschaftlichen Ratschläge und für die großzügige Unterstützung bei der Textverarbeitung dieser Arbeit.

Des weiteren gilt mein Dank den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau A. Kaiser und Frau I. Koukowitzos und allen übrigen Mitarbeitern der andrologischen Abteilung.

Herrn Oberarzt Dr. med. M. Meurer, Frau D. Nau und ihren Mitarbeiterinnen aus dem serologischen Routinelabor verdanke ich die Überlassung der Kontrollseren.

Den niedergelassenen Gynäkologen Dr. med. M. Littich und Dr. med. W. Bollmann verdanke ich die Seren und Zervikalschleime der infertilen Frauen.

Fräulein R. Büttner vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik in München sei für ihre freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse gedankt.

9. LEBENSLAUF

Am 25. April 1959 wurde ich, Hans Wolff, als Sohn des Kraftfahrzeugmechanikers Johann Wolff und seiner Frau Christa, geborene Gutt, im siebenbürgischen Weidenbach/Rumänien geboren.

Nach unserer Übersiedelung in die Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1964 besuchte ich ab 1965 die Grundschule in Grafing b. München und ab 1969 das mathematisch-naturwissenschaftliche und neusprachliche Gymnasium in Grafing, wo ich im Jahre 1979 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1979/80 begann ich an der Ludwig Maximilians-Universität zu München das Studium der Humanmedizin.

Im Sommersemester 1981 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, im SS 1982 das erste und im SS 1984 das zweite Staatsexamen.

Von April 1985 bis März 1986 absolvierte ich das Praktische Jahr und im April 1986 legte ich das dritte medizinische Staatsexamen ab.

